

**UNIVERSIDAD & SALAMANCA**

Facultad de Medicina  
Departamento de Fisiología y Farmacología  
Área Fisiología



ALFREDO SANABRIA CASTRO

**PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS EN  
EL EFECTO DEL  $\beta$  – AMILOIDE <sub>(25-35)</sub> SOBRE LAS  
NEURONAS PIRAMIDALES DE LA REGIÓN CA3 DEL  
HIPOCAMPO. ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO.**

Dirigida por: Dr. José María Criado Gutiérrez, Dr. Javier Yajeya Pérez y  
Dr. Antonio de la Fuente Juan

Salamanca, 2011.

D. José María Criado Gutiérrez, Profesor Titular del departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca; D. Javier Yajeya Pérez Catedrático de la Universidad de Salamanca y D. Antonio de la Fuente Juan Profesor Asociado del departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca,

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo realizado bajo nuestra dirección por D. Alfredo Sanabria Castro titulado: "PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS EN EL EFECTO DEL  $\beta$  – AMILOIDE <sup>(25-35)</sup> SOBRE LAS NEURONAS PIRAMIDALES DE LA REGIÓN CA3 DEL HIPOCAMPO. ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO." reúne las condiciones de originalidad para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmamos la siguiente certificación en Salamanca a 20 de setiembre de 2011.

Fdos:

Dr. José María Criado Gutiérrez

Dr. Javier Yajeya Pérez

Dr. Antonio de la Fuente Juan

## **AGRADECIMIENTOS**

---

Al cerrar una nueva etapa la cual parece inició ayer, hecho la vista atrás y recuerdo con gratitud gran cantidad de enseñanzas, experiencias, consejos y amistades cosechadas durante estos años. Por lo que me gustaría expresar mis agradecimientos especialmente a:

Mis padres y hermana que sin su apoyo ilimitado esto no sería una realidad.

A Josemari por pasar de ser un tutor a un amigo brindándome consejo y ayuda en todo momento. A Javi x *dicha* estabas allí con recomendaciones y soluciones a mis contrariedades y problemas técnicos. A Javier gracias por haberme admitido en el grupo de investigación, por esas sugerencias en las habituales pláticas mañaneras en su oficina y por su incondicional disponibilidad. Sin el aporte de ustedes tres este trabajo no sería lo mismo.

A Juande gracias por el apoyo brindado y por las horas de enseñanza mucho de lo que ahora sé te lo debo a vos. A Marga, Lidia y Adela gracias por sus consejos y comentarios los cuales invariablemente llegaban en buen momento dando fuerza en tiempos de flaqueza. A Noelia González y a Javi Blanco gracias por brindarme siempre una mano en el laboratorio. Y al equipo como un todo mi endeudamiento por haberme hecho sentir a gusto en todo momento.

Al Dr. Paz, Dra. King, Dr. Dietrich, Dr. Lewczuk, Puri, Luis V, Javier C, Lucho, Olga, Marce, Lean y Juancho gracias por sus comentarios y sugerencias. A todos aquellos que han puesto su confianza en mí, brindado ánimo y contribuido de una forma u otra a la realización de este trabajo:

*¡Muchas Gracias!*

*"La gota horada la roca, no por su fuerza sino por su perseverancia."*

*Publio Ovidio Nasón*

---

## ABREVIATURAS

---

A/A	células axoaxónicas
A <sub>2A</sub> R	receptor de adenosina A <sub>2A</sub>
ACh	acetilcolina
ADAM	metaloproteasas-desintegrinas
AHP	posthiperpolarización
AICD	dominio intracelular de la APP
AINEs	analgésicos anti-inflamatorios no esteroideos
AKAP	proteína de anclaje de la quinasa A
AMP	adenosin monofosfato
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroxi 5-metil-4-isoxazolepropionato
APH-1	<i>anterior pharynx defective phenotype 1</i>
APOE	apolipoproteína E
APP	proteína precursora amiloidea
APP $\alpha$	porción $\alpha$ amino terminal de la APP
APP $\beta$	porción $\beta$ amino terminal de la APP
APV ó AP5	ácido -2-amino-5-fosfonopentanoico
BACE 1	$\beta$ – site – APP - cleaving enzyme 1
BACE 2	$\beta$ – site – APP - cleaving enzyme 2
BDNF	factor neurotrófico derivado del cerebro
C	cisteína
Ca <sup>2+</sup>	iones calcio
Cdk5	quinasa dependiente de ciclina 5
CL	receptores de tipo <i>cys-loop</i>
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
CoA	coenzima A
CXCR2	receptor 2 de chemoquina
D	aspartato
DAG	diacilglicerol
DAMP	difenilacetoxi-N-metilpiperidina

DAP	postdespolarización
DOR	receptor opiode $\delta$
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
Dyrk 1A	serin/treonin quinasa de actividad dual
EA	Enfermedad de Alzheimer
EEG	electroencefalograma
E <sub>K</sub>	potencial de equilibrio del potasio
EO	estrés oxidativo
ERK	quinasa regulada por señales extracelulares
FAD	<i>Familial Alzheimer Disease</i>
fAHP	posthiperpolarización rápida
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	gramos
G	glicina
GABA	ácido $\gamma$ - aminobutírico
GAP	proteína aceleradora de la actividad GTPasa
GCPRs	receptores acoplados a proteína G
GDP	guanosin difosfato
GEF	factor intercambiador de guanina
Gp-p	glicoproteína p
GPR3	receptor 3 acoplado a proteína G
GSAP	proteína activadora de la $\gamma$ – secretasa
GSK-3	glicógeno sintasa quinasa 3
GTP	guanosin trifosfato
HCN	<i>hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated</i>
hERG	canales de potasio dependientes de voltaje
i.e.	por ejemplo
I <sub>A</sub>	corriente transitoria
I <sub>C</sub>	corriente de potasio activada por calcio
I <sub>D</sub>	corriente sensible a 4-AP
IDE	enzima degradadora de insulina
I <sub>K</sub>	corriente de potasio rectificadora tardía

$I_{K(ATP)}$	corriente de potasio sensible a ATP
$I_{K(IR)}$	corriente con rectificación hacia dentro
$I_M$	corriente M
IP	intraperitoneal
IP3	inositol trifosfato
$K^+$	iones potasio
KCNQ o Kv7	canales de potasio dependientes de voltaje
L/M	células lacunosum-molecular
LGICs	<i>ligand-gated ion channels</i>
LOAD	<i>late Onset Alzheimer's Disease</i>
LPR-1	<i>lipoprotein receptor-related protein-1</i>
LTD	depresión de larga duración
LTP	potencialización a largo plazo
mAChRs	receptores muscarínicos de acetilcolina
mAHP	posthiperpolarización media
MAPK	proteína quinasa activada por mitógenos
MCI	deterioro cognitivo leve
mGluRs	receptores metabotrópicos de glutamato
ml	mililitros
ms	milisegundos
mV	milivoltios
$M\Omega$	megaohmios
nA	nanoamperios
nAChRs	receptores nicotínicos de acetilcolina
nM	nanomolar
$Na^+$	iones sodio
NCSTN	nicastrina
NEP	neprilisina
NINCDS-ADRDA	<i>National Institute of Neurologic and Communicative Disorders and Stroke - Alzheimer's Disease and related Disorders Association</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato
O/A	neuronas oriens-alveus

O/LM	células oriens-lacunosum-moleculares
p	p-valor
P	prolina
PEN – 2	<i>PS- enhancer -2</i>
pFHHSiD	<i>para-flouro-hexahidro-sila-difenidol</i>
PI	fosfatidilinositol
PI3K	fosfatidilinositol-3-quinasa
PI4K	fosfatidilinositol-4-quinasa
PI5K	fosfatidilinositol-5-quinasa
PIP	fosfatidilinositol-4-fosfato
PIP2	fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PKA	proteína quinasa dependiente de cAMP
PKC	proteína quinasa C
PLC	fosfolipasa C
PPs	fosfoproteín fosfatasas
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	receptores activados por proliferadores de peroxisomas gamma
PPI	interacciones proteína – proteína
PSEN1	gen de la presenilina 1
PSEN2	gen de la presenilina 2
RAGE	receptores de productos avanzados de glicación
RER	resistencia de entrada relativa
Rm	resistencia de la membrana
ROS	especies reactivas de oxígeno
RS	retículo endoplásmico
sAHP	posthiperpolarización tardía lenta
SFA	<i>spike frequency adaptation</i>
sid	<i>subunit interaction domain</i>
siRNA	fragmentos de ARN interferente
TTX-s	canales de sodio sensibles a TTX
$\tau$	proteína tau
TAC	tomografía axial computarizada
TEA	tetraetilamonio



W	triptófano
$\beta 2$ -AR	receptor adrenérgico $\beta 2$
$\beta A$	péptido $\beta$ - amiloide
$\beta ARs$	receptores $\beta$ – adrenérgicos
$\mu M$	micromolar
$\mu m$	micrómetros
4-AP	4-aminopiridina

## Índice de contenidos

<b>1 Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.0 Antecedentes y situación actual .....	2
1.1 Enfermedad de Alzheimer .....	5
1.1.1 Factores causales o de riesgo en la enfermedad de Alzheimer .....	7
1.1.2 Apolipoproteína E como factor de riesgo genético.....	9
1.1.3 Otros factores de riesgo.....	10
1.1.4 Factores de riesgo no genético.....	11
1.2 Patogenia de la enfermedad de Alzheimer.....	13
1.2.1 Teoría colinérgica de la enfermedad de Alzheimer.....	13
1.2.2 Teoría de la cascada amiloide .....	14
1.2.3 La proteína Tau.....	22
1.2.4 Contribución del estrés oxidativo en la patogenia de la EA .....	24
1.3 Calcio y la patología neuronal .....	25
1.4 Neurotransmisión glutamatérgica.....	25
1.5 Lesiones cerebrales en la enfermedad de Alzheimer.....	28
1.6 Afectación colinérgica cerebral en la enfermedad de Alzheimer .....	30
2.0 El hipocampo.....	32
2.1 Circuitos interneuronales a nivel de hipocampo .....	37
2.2 Conexiones intrínsecas del hipocampo .....	39
2.3 Aferencias y eferencias del hipocampo .....	40
2.4 Circuito de Papez .....	40
2.5 Aspectos funcionales y clínicos relacionados con el hipocampo.....	41
3.0 Neurotransmisión colinérgica .....	42
3.1 Receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs).....	45
3.2 Receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChRs).....	48
3.3 Transducción de la señal de los receptores muscarínicos de acetilcolina.....	56
3.4 Canales de potasio KCNQ ó Kv7 .....	62

4.0 Estrategias terapéuticas en la enfermedad de Alzheimer .....	73
4.1 Precursores de la síntesis de acetilcolina.....	76
4.2 Agonistas / Antagonistas de receptores muscarínicos de acetilcolina .....	76
4.3 Agonistas del receptor nicotínico de acetilcolina .....	78
4.4 Inhibidores de la acetilcolinesterasa.....	79
4.5 Moduladores alostéricos de los receptores nicotínicos neuronales .....	80
4.6 Estrategias terapéuticas en evaluación .....	80
4.6.1 Inhibidores de la $\gamma$ - secretasa .....	81
4.6.2 Inhibidores de la actividad $\beta$ - secretasa.....	82
4.6.3 Inhibidores de la oligomerización del $\beta$ – amiloide.....	83
4.6.4 Inhibidores de la fosforilación y agregación de la proteína tau .....	83
4.6.5 Inmunización .....	84
4.6.6 Utilización de estatinas .....	84
4.7 Otros acercamientos preventivos, terapéuticos y posibles aplicaciones a futuro .....	85
 <b>2 Objetivos .....</b>	 <b>87</b>
2.1 Objetivo general .....	88
2.2 Objetivos específicos.....	88
 <b>3 Materiales y Métodos .....</b>	 <b>89</b>
3.1 Animales de experimentación .....	90
3.2 Estudio electrofisiológico .....	90
3.2.1 Aislamiento del encéfalo .....	90
3.2.2 Obtención de las rodajas .....	91
3.2.3 Incubación de las rodajas .....	92
3.2.4 Cámara de registro y soluciones empleadas .....	93
3.3 Registro actividad eléctrica neuronal .....	95
3.3.1 Electrodo de registro .....	95
3.3.2 Disposición de electrodos .....	96
3.4 Protocolos experimentales de registro intracelular .....	98
3.4.1 Caracterización neuronal .....	98

3.4.1.1 Propiedades electrofisiológicas de las neuronas de la región CA3 del hipocampo .....	98
3.4.2 Protocolo farmacológico.....	101
3.4.2.1 Protocolo electrofisiológico .....	101
3.4.2.2 Fármacos utilizados .....	102
3.4.2.3 Utilización de antagonistas muscarínicos no selectivos.....	104
3.4.2.4 Utilización de antagonistas muscarínicos del subtipo M1 selectivos .....	105
3.4.2.5 Aplicación de agonistas muscarínicos .....	105
3.4.2.6 Utilización de inhibidores de la proteína quinasa C .....	105
3.4.2.7 Empleo de antagonistas del receptor intracelular de inositol trifosfato (IP3).....	105
3.4.2.8 Utilización de bloqueantes de canales de potasio tipo KCNQ .....	106
3.5 Adquisición y almacenamiento de los datos .....	106
3.6 Análisis de los datos .....	106
3.7 Estadística de los datos .....	107
3.8 Representación gráfica .....	108
 <b>4 Resultados.....</b>	 <b>109</b>
4.1 Estudio de caracterización electrofisiológica .....	110
4.1.1 Tipos celulares identificados en la región CA3 del hipocampo de la rata .....	110
4.1.2 Caracterización electrofisiológica de las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo de la rata .....	112
4.1.3 Curvas de corriente - voltaje .....	119
4.2 Estudio farmacológico .....	122
4.2.1 Utilización de antagonistas muscarínicos no selectivos.....	122
4.2.2 Utilización de antagonistas muscarínicos para el subtipo M1 .....	125
4.2.3 Aplicación de agonistas muscarínicos .....	128
4.2.4 Utilización de inhibidores de la proteína quinasa C (PKC).....	132
4.2.5 Utilización de antagonistas del receptor intracelular de inositol trifosfato (IP3) .....	135
4.2.6 Utilización de bloqueantes de canales de potasio .....	137
4.2.7 Análisis de datos .....	146

<b>5 Discusión .....</b>	<b>148</b>
5.1 Estudio electrofisiológico .....	149
5.1.1 Caracterización electrofisiológica y tipos celulares identificados en la región CA3 del hipocampo de la rata.....	149
5.1.2 Características electrofisiológicas de las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo de la rata .....	150
5.1.3 Curvas de corriente - voltaje .....	154
5.2 Estudio farmacológico .....	156
5.2.1 Utilización de antagonistas muscarínicos .....	156
5.2.2 Aplicación de agonistas muscarínicos .....	158
5.2.3 Utilización de inhibidores de la proteína quinasa C (PKC).....	161
5.2.4 Utilización de antagonistas del receptor intracelular de inositol trifosfato (IP3) .....	162
5.2.5 Utilización de bloqueantes de canales de potasio .....	164
 <b>6 Conclusiones .....</b>	 <b>168</b>
 <b>7 Referencias Bibliográficas .....</b>	 <b>171</b>

## Índice de figuras

F 1.1	Principales causas de muerte a principios y a finales del siglo XX.....	2
F 1.2	Variación en la incidencia de distintas patologías en la segunda mitad del siglo XX.....	3
F 1.3	Procesamiento amiloidogénico y no amiloidogénico de la APP.....	18
F 1.4	Producción del péptido $\beta$ – amiloide a partir de rupturas proteolíticas secuenciales de la APP.....	20
F 1.5	Receptor de glutamato tipo NMDA.....	27
F 1.6	Corte coronal de la formación hipocampal humana y estructuras relacionadas.....	33
F 1.7	Esquema de neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo.....	35
F 1.8	Principales tipos de interneuronas presentes en el hipocampo.....	37
F 1.9	Principales relaciones neuronales en la región CA1 del hipocampo.....	38
F 1.10	Representación esquemática vías intrínsecas de transmisión de información a nivel de hipocampo.....	39
F 1.11	Representación de las vías de comunicación entre la formación hipocampal y el diencefalo.....	41
F 1.12	Síntesis, almacenamiento y secreción de la acetilcolina.....	43
F 1.13	Liberación por exocitosis de acetilcolina.....	44
F 1.14	Degradación hidrolítica de la acetilcolina.....	45
F 1.15	Estructura de los receptores nicotínicos de acetilcolina.....	46
F 1.16	Conformación y acoplamiento de los segmentos transmembrana y las subunidades del receptor nicotínico de acetilcolina.....	48
F 1.17	Principales clases y funciones de los monómeros $\alpha$ de las proteínas G.....	49
F 1.18	Representación de la secuencia y estructura del receptor muscarínico M3 de rata.....	51
F 1.19	Representación esquemática del receptor muscarínico de acetilcolina.....	51
F 1.20	Principales agonistas, antagonistas, localización y vía de señalización de los receptores muscarínicos según subtipo.....	54
F 1.21	Cantidad de receptores muscarínicos de acetilcolina por región cerebral según subtipo.....	56
F 1.22	Señalización remota de los receptores muscarínicos y vía de señalización del receptor muscarínico M1.....	57
F 1.23	Formación del fosfatidilinositol-4,5- bífosfato (PIP <sub>2</sub> ) y efecto de la fosfolipasa C (PLC).....	58
F 1.24	Principales efectos directos e indirectos de la liberación de calcio intracelular.....	59
F 1.25	Vía de señalización del receptor muscarínico M1.....	60
F 1.26	Esquema general de las subunidades protéicas del canal de potasio KCNQ.....	64
F 1.27	Ensamblaje de subunidades de los canales Kv7.....	65
F 1.28	Corrientes generadas por cambios de voltaje en oocitos de <i>Xenopus</i> que expresan canales KCNQ.....	68
F 1.29	Respuesta neuronal y cambios en la apertura de los canales KCNQ.....	71
F 1.30	Posibles dianas terapéuticas para mejorar la neurotransmisión colinérgica.....	74
F 1.31	Principales fármacos utilizados y en investigación para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.....	75
F 3.1	Tallado de la pieza donde se observa un corte coronal de cerebro a nivel de hipocampo, a partir del cual se obtienen las rodajas.....	91
F 3.2	Vibratomo Leica VT 1000 S empleado para obtener las rodajas de hipocampo.....	92

F 3.3	Esquema de cámara de incubación utilizado para incubación de las rodajas de hipocampo .....	93
F 3.4	Cámara de registro de la actividad neuronal BSC-HT .....	94
F 3.5	Estirador de pipetas Sutter P87 utilizado en la fabricación de los electrodos de registro .....	95
F 3.6	Amplificador de registros intracelulares Bio Logic modelo VF180.....	96
F 3.7	Microscopio Axioskop utilizado para la localización electrodos, Zeiss, Inc., EE.UU .....	96
F 3.8	Localización del electrodo de registro en una rodaja coronal de hipocampo .....	97
F 3.9	Generador de pulsos programable Master-8 .....	97
F 3.10	Propiedades activas de la membrana.....	100
F 4.1	Caracterización electrofisiológica del potencial de acción de una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo .....	111
F 4.2	Esquema general de los patrones de disparo encontrados en las neuronas piramidales registradas.....	113
F 4.3	Patrón de disparo de espiga única de una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo .....	113
F 4.4	Patrón de disparo en fases de una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo .....	115
F 4.5	Patrón de disparo tónico de una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo .....	117
F 4.6	Potencial de acción espontáneo en forma de ráfaga o "burst" de una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo .....	118
F 4.7A	Respuesta de una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo a la inyección de pulsos de corriente hiperpolarizantes y despolarizantes.....	120
F 4.7B	Curva corriente - voltaje en estado estacionario para la misma neurona .....	120
F 4.8	Curva corriente - voltaje en estado estacionario para una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo donde se observan rectificaciones aparentes en los valores fisiológicos de voltaje .....	121
F 4.9	Registro intracelular en la modalidad de fijación de corriente de una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo en condiciones control y durante la perfusión con atropina y $\beta$ – amiloide (25-35) .....	124
F 4.10	Variación de la resistencia de entrada ( $M\Omega$ ) con respecto al tiempo (m) en una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo en situación control y tras la perfusión con atropina y $\beta$ – amiloide (25-35) .....	125
F 4.11	Registro intracelular en la modalidad de fijación de corriente de una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo en condiciones control y tras la perfusión con pirenzepina y $\beta$ – amiloide (25-35).....	127
F 4.12	Variación de la resistencia de entrada ( $M\Omega$ ) con respecto al tiempo (m) en una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo en estado de reposo y tras la perfusión de distintas drogas.....	128
F 4.13	Registro intracelular en la modalidad de fijación de corriente de una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo en situación control y tras la perfusión con muscarina y $\beta$ – amiloide (25-35) .....	129
F 4.14	Variación de la resistencia de entrada ( $M\Omega$ ) con respecto al tiempo (m) en una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo .....	130
F 4.15	Registro intracelular en la modalidad de fijación de corriente de una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo en condiciones control, tras la perfusión con un agonista selectivo de los receptores muscarínicos subtipo M1 y finalmente tras perfundir con $\beta$ – amiloide (25-35) .....	131
F 4.16	Variación de la resistencia de entrada ( $M\Omega$ ) con respecto al tiempo (m) en una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo perfundida con McN-A-343 y posteriormente con $\beta$ – amiloide (25-35) .....	132

F 4.17 Registro intracelular en la modalidad de fijación de corriente de una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo en reposo, tratada con un inhibidor de la proteína quinasa C (PKC) y posteriormente con $\beta$ – amiloide (25-35) .....	133
F 4.18 Variación de la resistencia de entrada ( $M\Omega$ ) con respecto al tiempo (m) en una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo en reposo tras la perfusión con un inhibidor de la proteína quinasa C y posteriormente con $\beta$ – amiloide (25-35) .....	134
F 4.19 Registro intracelular en la modalidad de fijación de corriente de una neurona piramidal en reposo, de la región CA3 del hipocampo la cual se trata con un antagonista de los receptores de inositol trifosfato (IP3) previamente a la perfusión con $\beta$ – amiloide (25-35). ....	136
F 4.20 Variación de la resistencia de entrada ( $M\Omega$ ) con respecto al tiempo (m) para una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo tras la perfusión con un antagonista del receptor de IP3 y posteriormente con $\beta$ – amiloide (25-35) .....	137
F 4.21 Registro intracelular en la modalidad de fijación de corriente de una neurona piramidal en estado basal de la región CA3 del hipocampo en condiciones control y tras la perfusión con linopiridina como bloqueante del canal de potasio tipo KCNQ y posteriormente con $\beta$ – amiloide (25-35) .....	140
F 4.22 Variación de la resistencia de entrada ( $M\Omega$ ) con respecto al tiempo (m) en una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo en condiciones control, tras la perfusión con linopiridina (bloqueante de canales de potasio KCNQ) y con $\beta$ – amiloide (25-35) .....	141
F 4.23 Registro intracelular en la modalidad de fijación de corriente de una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo en condiciones control, tras la perfusión con XE991 bloqueante de los canales de potasio KCNQ y posteriormente con $\beta$ – amiloide (25-35) .....	142
F 4.24 Variación de la resistencia de entrada ( $M\Omega$ ) con respecto al tiempo (m) en una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo en condiciones control y tras la perfusión con XE991 y posteriormente con $\beta$ – amiloide (25-35) .....	143
F 4.25 Registro intracelular en la modalidad de fijación de corriente de una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo en condiciones control y tras la perfusión con cloruro de bario y posteriormente con $\beta$ – amiloide (25-35) .....	144
F 4.26 Variación de la resistencia de entrada ( $M\Omega$ ) con respecto al tiempo (m) para una neurona piramidal en condiciones control y tras la perfusión con cloruro de bario y beta amiloide .....	145
F 5.1 Efecto del péptido $\beta$ - amiloide (25-35) sobre la resistencia de entrada de neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo al utilizar antagonistas o agonistas muscarínicos del tipo M1 .....	160
F 5.2 Efecto del péptido $\beta$ - amiloide (25-35) sobre la resistencia de entrada de neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo al utilizar inhibidores de la proteína quinasa C e inhibidores del receptor de IP3 .....	163
F 5.3 Efecto del péptido $\beta$ - amiloide (25-35) sobre la resistencia de entrada de neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo al utilizar bloqueantes del canal de potasio KCNQ .....	165



## Índice de tablas

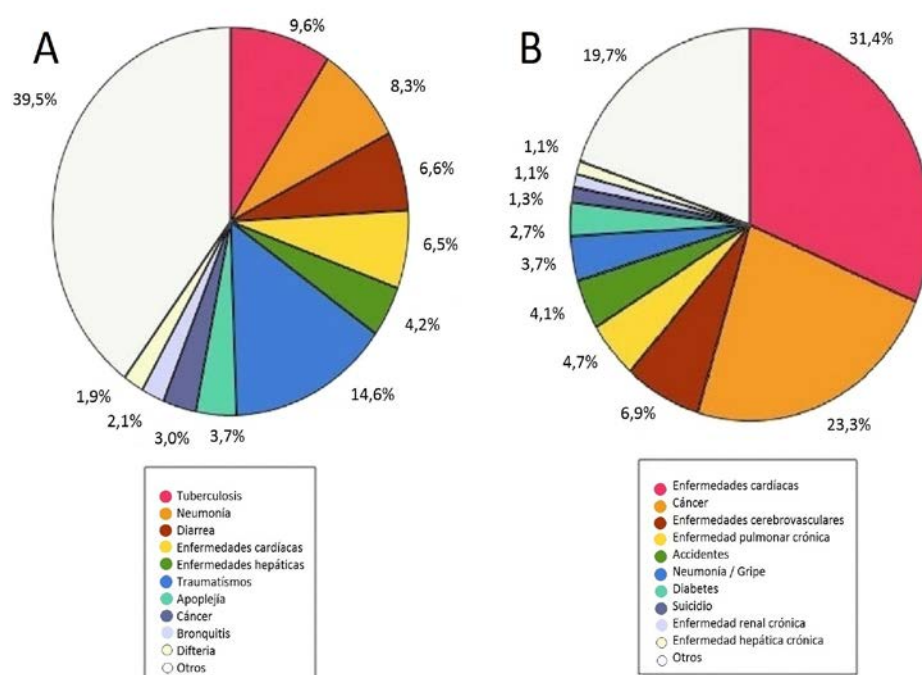
T 1.1 Principales genes afectados en la Enfermedad de Alzheimer .....	7
T 1.2 Factores que pueden modificar riesgo de sufrir Enfermedad de Alzheimer .....	9
T 1.3 Valores de la constante de disociación (pKB) para antagonistas de los receptores muscarínicos de acetilcolina en mamíferos según subtipo .....	54
T 1.4 Subunidades de los canales Kv7, localización, gen codificante, subunidades de asociación, corriente regulada, función y canalopatías asociadas. ....	67
T 1.5 Efecto de bloqueadores de canales de potasio sobre la $I_M$ .....	71
T 3.1 Composición de las soluciones de Krebs empleadas en la obtención e incubación de las rodajas.....	95
T 4.1 Principales propiedades electrofisiológicas de las neuronas piramidales registradas en la región CA3 del hipocampo de rata según patrón de disparo.....	114
T 4.2 Resistencia de entrada relativa de las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo según protocolo utilizado en dos estadios (S1, S2).....	145

## **1. INTRODUCCIÓN**

---

## 1.0 ANTECEDENTES Y SITUACIÓN ACTUAL

A principios del siglo XX las enfermedades infecciosas como tuberculosis, diarrea y neumonía constituían la principal causa de muerte (ver figura 1.1). Debido a la elevada mortalidad que representaban este tipo de patologías la esperanza de vida permanecía baja y variable según las diferentes regiones del planeta. Mejoras en sanidad, hábitos y estilos de vida de la población produjeron cambios significativos en las causas de muerte a lo largo del siglo XX (Cohen, 2000; Seabrook y cols, 2007, Reitz, y cols, 2011). Con el retroceso en la mortalidad por enfermedades infecciosas se ha producido un repunte en las muertes debidas a enfermedades crónicas (ver figura 1.1).

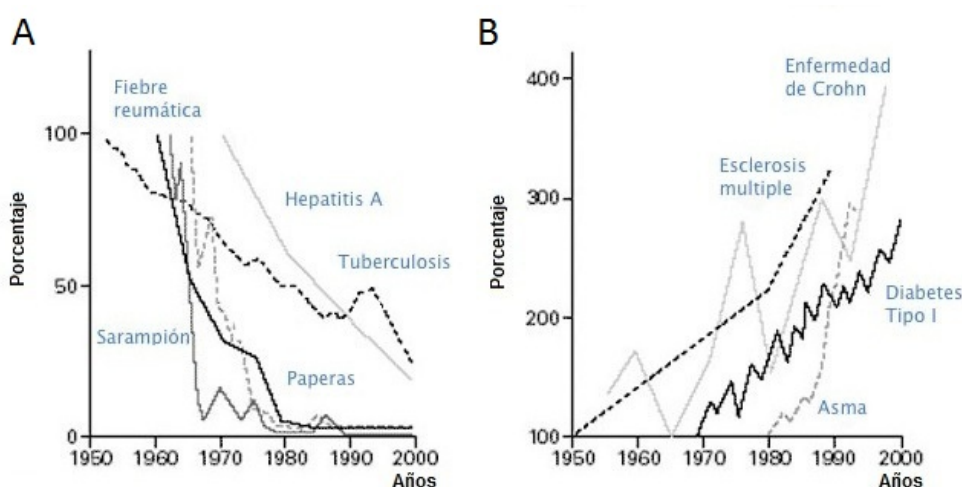


**Figura 1.1 Principales causas de muerte a principios y a finales del siglo XX.** A: Porcentaje de muertes según causa ocurridas durante los primeros años del siglo XX. B: Principales causas de muerte en porcentaje a finales del siglo XX. Fuente: Adaptado de Cohen, 2000.

En términos generales la incidencia de enfermedades infecciosas ha mostrado una disminución a través del tiempo mientras ocurre un aumento paralelo en la incidencia de

patologías crónicas como: enfermedades neurodegenerativas, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, asma, diabetes, etc (ver figura 1.2). Aumento que había venido afectando sobre todo a países desarrollados (Dong y cols, 2009), sin embargo el último informe mundial de Alzheimer del año 2010 hace mención a la presencia de dos tercios de los casos de Alzheimer en países en vías de desarrollo.

En los últimos años la esperanza de vida ha aumentado de forma considerable en el 2005 la media mundial era de 66,7 años, cifras que varían considerablemente entre continentes (Peña y cols, 2006). Comparando el mismo período entre los siglos XX y XXI en países desarrollados la cantidad de personas centenarias ha aumentado en un factor mayor a 10 (Lister y Barnes, 2009). Se estima que en el periodo comprendido entre 1990 y el 2020 la población de adultos mayores aumente un 200% y que aproximadamente el 65% de esta población habite en países en vías de desarrollo (Prince y Jackson, 2009). El considerable aumento de la población de adultos mayores ha incrementado de forma sustancial la incidencia y prevalencia de ciertas patologías (Reitz y cols, 2011).



**Figura 1.2 Variación en la incidencia de distintas patologías en la segunda mitad del siglo XX.** A: Variación en la incidencia de patologías infecciosas a lo largo de los últimos años del siglo XX. B: Variación en la incidencia de patologías crónicas a lo largo de la segunda mitad del siglo XX. Fuente: Adaptado de Cohen , 2000.

Las patologías nerviosas que aquejan a la población de adultos mayores en las que se produce una afectación del sistema nervioso son de trascendental importancia por el impacto

que representan a nivel de autonomía individual, salud pública, familia, sociedad, y economía (Ropper y Brown, 2005; Prince y Jackson, 2009; Wimo y Prince, 2010).

Debido a su aumento e impacto estas patologías han llegado a considerarse como una epidemia (Citron, 2010). Las afecciones nerviosas que aquejan a la población de adultos mayores, cursan con alteraciones en el número y/o funcionalidad de distintos receptores como: la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson. Con implicaciones trascendentales en funciones básicas, motoras, sensoriales o de aprendizaje y memoria (Langmead y cols, 2008; Sadock y Sadock, 2008).

Aunque la existencia de encuestas epidemiológicas bien planificadas es escasa en muchas regiones a nivel mundial, es conocido que la EA es el proceso neurodegenerativo de mayor prevalencia. Actualmente afecta a más de 37 millones de personas a nivel mundial (Wimo y Prince, 2010) cifra que según estimados se alcanzaría en el 2025 (Sweatt, 2010).

Anualmente se diagnostican más de 5 millones de casos nuevos de Alzheimer por lo que se considera la primera causa de patologías psicológicas y neurodegenerativas en el adulto mayor y la tercera causa de muerte entre adultos mayores de 65 años en los países desarrollados (Wang y Ding, 2008). A su vez se estima que el número de casos de Alzheimer diagnosticados se duplica cada veinte años, por lo que para el 2030 habrá más de 65 millones de casos y para el 2050 más de 115 millones (Wimo y Prince, 2010).

La EA es una patología crónica, progresiva y multisistémica, que fue descrita por primera vez en año 1906 por el psiquiatra y neurólogo alemán Alois Alzheimer (Alzheimer, 1907). Actualmente constituye un 60 % de todos los tipos de demencia, su prevalencia es de entre un 5 % a 10 % en personas mayores de 65 años y supera el 25 % en mayores de 85 años (Guardia-Laguarta, 2010) es más se estima que 1 de cada 3 adultos mayores de 80 años presenta la enfermedad (Rushworth y Hooper, 2011). Se observa como tanto la incidencia como la prevalencia se duplican al aumentar cada 5 años la edad de la población riesgo (Wimo y Prince, 2010).

En EA o demencia degenerativa primaria destacan los trastornos de la memoria y otras funciones cognitivas, cambios conductuales, funcionales, emocionales y de personalidad (Ira, 2008).

Dentro de los factores de riesgo de la EA el único bien conocido es la edad (Prince y Jackson, 2009). La incidencia familiar como factor de riesgo en esta patología también es importante y se considera como el factor de riesgo de mayor importancia después de la edad,

presentándose en más de un 40% de los casos (Sadock y Sadock, 2008). Entendiendo por incidencia familiar a la constatación diagnóstica realizada por un especialista, en al menos un familiar de primer grado (padres o hermanos) del paciente (Upadhyaya y cols, 2010).

## 1.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)

En la actualidad el diagnóstico de la EA se basa en los criterios desarrollados por el *National Institute of Neurologic and Communicative Disorders and Stroke - Alzheimer's Disease and related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA). La demencia se define como un síndrome de comienzo gradual, con progresión de al menos seis meses, que cursa con pérdida de memoria y afectación de otras capacidades cognitivas, incluyendo orientación, juicio y resolución de problemas. Afectando actividades de la vida diaria del paciente. El DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) establece la distinción entre dos clases de demencia tipo Alzheimer: una de inicio temprano antes de los 65 años de edad o FAD de sus siglas en inglés (*Familial Alzheimer Disease*) y otra de inicio tardío cuando se presentan los primeros síntomas luego de los 65 años de edad o LOAD (*Late Onset Alzheimer's Disease*), siendo ésta a la que nos referiremos comúnmente.

El deterioro cognitivo leve o MCI de sus siglas en inglés (*Mild Cognitive Impairment*) es la transición entre el proceso normal de envejecimiento y la EA, donde ocurren una serie de cambios cognitivos y neuroquímicos como la pérdida receptores de acetilcolina y cambios en la concentración de distintas proteínas a nivel de líquido cefalorraquídeo. En el MCI se evidencian alteraciones neuropatológicas intermedias entre las observadas durante el envejecimiento normal y la encontradas en la EA (Pertersen y cols, 2006). Los cambios cognitivos durante este proceso no representan gran severidad para considerarse como una demencia. Principalmente se presenta como una alteración aparente de la memoria con conservación de la capacidad funcional (Sweatt, 2010), sin embargo se considera como una fase prodrómica de la EA (Sabbagh y cols, 2006). Se estima que la transición entre el MCI y la EA se produce una vez que la afección alcanza el lóbulo temporal medio (Pertersen y cols, 2006).

El diagnóstico del MCI es difícil ya que su descripción es relativamente reciente además los límites entre el deterioro cognitivo leve y el rendimiento cognitivo normal en el anciano no son tajantes (Petersen y Morris, 2005, Petersen y cols, 2006).

La EA presenta 5 fases evolutivas y al igual en que otros tipos de demencias progresivas, la memoria a corto plazo se ve afectada desde el inicio. En la fase inicial los pacientes presentan grandes dificultades para aprender cosas nuevas y la afectación se observa principalmente a nivel del lóbulo temporal y en la zona del giro dentado del hipocampo (Sambamurti y cols, 2009). En la fase temprana de la enfermedad se ven afectadas la memoria a largo plazo y otras áreas del conocimiento como: el pensamiento abstracto, juicio, lenguaje y personalidad (Sadock y Sadock, 2008). Interfiriendo con las relaciones sociales y ocasionando un compromiso funcional de paciente. Durante este periodo la afectación se produce principalmente a nivel del lóbulo parietal (Sambamurti y cols, 2009).

Durante la fase intermedia se presenta un mayor compromiso del área cognitiva con desorientación en lugar, tiempo y espacio. En la fase tardía de la patología la afectación alcanza el lóbulo frontal (Sweatt, 2010) presentándose síntomas neurológicos importantes (Ropper y Brown, 2005) como psicosis con paranoia, alucinaciones e indiferencia afectiva. Finalmente la EA termina con la incapacidad total del paciente y la muerte aproximadamente una década después del diagnóstico (Citron, 2010).

En términos generales la evolución de la EA es variable y difícil de determinar. La presencia de periodos estables de uno o dos años de duración entre periodos progresivos es común, sin embargo se estima entre 5 a 10 años, con una media de 8,5 años, al intervalo de tiempo entre la aparición de los síntomas y la muerte (Upadhyaya y cols, 2010).

Para un diagnóstico adecuado de la EA son necesarios: exámenes físicos y neurológicos (electroencefalograma (EEG), exámenes de potenciales evocados), así como la historia clínica y familiar del paciente. El diagnóstico definitivo solo se puede realizar *post mortem* por medio de la determinación histopatológica (Sambamurti y cols, 2009; Guardia-Laguarta, 2010).

El diagnóstico de la EA es difícil, en este momento están en desarrollo técnicas para establecer marcadores biológicos determinantes de alta especificidad como mediciones de proteína amiloide y sus derivados en líquido cefalorraquídeo (Finehout y cols, 2007; De Meyer y cols, 2010; Fukumoto y cols, 2010; Lewczuk y Kornhuber, 2011). Las pruebas de laboratorio de uso común en la actualidad no son diagnósticas su utilidad versa en la exclusión de otras patologías. Dentro de ellas se pueden mencionar las determinaciones de: neurotransmisores, acetilcolinesterasa, aminas biógenas y neuropéptidos. Otras pruebas complementarias en el diagnóstico de la EA incluyen los métodos de neuroimagen. Las pruebas de tomografía axial

computarizada (TAC) cerebral y la resonancia magnética muestran que los pacientes con la EA poseen una atrofia cortical e hipocampal así como una dilatación de los ventrículos lateral y tercero (Teipel y cols, 2006). Situación que también puede observarse en individuos sanos de la misma edad, por lo que actualmente muchos esfuerzos se enfocan en la búsqueda de un diagnóstico certero mediante técnicas de neuroimagen (Padilla y cols, 2010; Walhovd y cols, 2010; Chételat, 2011; Kantarci y cols, 2011).

Las principales patologías con las que es primordial realizar un diagnóstico diferencial con la EA son: la demencia frontotemporal, la enfermedad de Creutzfeld – Jacob, la demencia de cuerpos de Lewy. A su vez se debe tener en cuenta que algunos fármacos y el alcohol pueden causar pérdidas temporales de la memoria y otros síntomas similares a la demencia (Hardy, 2006b).

### 1.1.1 FACTORES CAUSALES O DE RIESGO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Las mutaciones causales como su nombre lo indica son causa suficiente, aunque no necesaria para originar la EA, a diferencia de un factor de riesgo determinado que no es suficiente ni necesario para que aparezca la afección. Las mutaciones causales son relativamente pocas y ocasionan la EA de tipo familiar, la cual presenta patrones de herencia autosómica dominante (Itzhaki y cols, 2008), y representa solamente un porcentaje bajo de la totalidad de casos de EA descritos (Ropper y Brown, 2005; Wu y Zhang, 2009).

Las mutaciones causales identificadas son: las del gen de la proteína precursora amiloidea (APP) en el cromosoma 21, las mutaciones del gen de la presenilina 1 (PSEN1) en el cromosoma 14 y las del gen de la presenilina 2 (PSEN2) (ver tabla 1.1) (Brouwers y cols, 2008; Naj y cols, 2011; Wu y cols, 2011).

Tabla 1.1 Principales genes afectados en la Enfermedad de Alzheimer.

PATOLOGÍA	GEN MUTADO	LOCUS	PROTEÍNA CODIFICA
FAD	APP	21q21.3-q22.05	Proteína precursora amiloidea
FAD	PSEN1	14q24.3	Presenilina 1
FAD	PSEN2	1q31-q42	Presenilina 2
LOAD	APOE	19q13.2	Apolipoproteína E

FAD: Familial Alzheimer Disease, LOAD: Late Onset Alzheimer's Disease. Fuente: Tanzi y Bertram, 2005, Brouwers y cols, 2008.



Las mutaciones en el gen de la proteína precursora amiloidea (APP) que dan lugar a la EA se concentran en las zonas adyacentes a los sitios de corte de la APP por enzimas con actividad secretasa ( $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ ). Dichas mutaciones pueden conducir a una inhibición de corte por las  $\alpha$  secretasas o a facilitar el corte por las secretasas  $\beta$  y/o  $\gamma$  (ver sección 1.2.2) (Goate, 2006). Aunque hay descritas más de 30 mutaciones en el gen de la APP que producen EA, las mutaciones en dicho gen solo constituyen la minoría de los casos de EA familiar (Goedert y Spillantini, 2006; De Strooper, 2010; Guardia-Laguarta, 2010). La existencia de más de 180 tipos distintos de mutaciones en el gen que codifica para la PSEN1 así como mutaciones y polimorfismos en la región promotora de este gen hacen que mutaciones a este nivel sean la forma más frecuente de EA autosómica dominante (Small y Mayeux, 2005; Goedert y Spillantini, 2006; De Strooper, 2010; Wu y cols, 2011).

Dada la presencia de grupos familiares que presentan una clara manifestación de la EA en las cuales no se detectan mutaciones en ninguno de los genes anteriormente mencionados no se descarta que haya más genes cuyas mutaciones sean causa suficiente de la patología (Mohandas y cols, 2009). Aunque las mutaciones causales son por si solas factores suficientes para que se produzca la EA, casi todos los casos de la patología son de origen multicausal. Así los casos de la enfermedad de Alzheimer de aparición tardía no presentan un patrón de herencia mendeliana monogénica lo cual indica una patogenia es compleja y multifactorial donde intervienen factores genéticos y ambientales (Hardy, 2006a, De Strooper y cols, 2010; Hollingworth y cols, 2011). Los agentes ambientales se consideran factores de riesgo en la EA ya que se han descrito casos donde gemelos idénticos presentan ocurrencia distinta de la patología (Lin y cols, 2001).

Los factores de riesgo se deben entender como circunstancias intermedias que pueden alterar la susceptibilidad de padecer la EA ya sea aumentándola o disminuyéndola mostrando un efecto indirecto sobre la verdadera causa de la patología (ver tabla 1.2).

Estudios epidemiológicos identifican a la edad como el factor de riesgo sociodemográfico determinante y existe consenso absoluto que el envejecimiento es la característica principal para el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas como la EA (Harman, 2006; Farooqui y Farooqui, 2009; Prince y Jackson, 2009; Llewellyn y cols, 2010). Sin embargo la razón de esta situación es controvertida y se ha asociado a diversas teorías como: disminución de la autofagia, estrés oxidativo y formación aumentada de superóxido dismutasa por la

mutación de los genes implicados en la biogénesis mitocondrial (Nunomura y cols, 2006; Porta y cols, 2007; Sambamurti y cols, 2009).

Tabla 1.2 Factores que pueden modificar riesgo de sufrir Enfermedad de Alzheimer.

RIESGO	GENÉTICOS	DEMÓGRAFICOS	CLÍNICOS	OTROS
<b>M A Y O R</b>	APOE ε4 Trisomía 21 Polimorfismos (cromosomas 6,9,10 y 12) Historia Familiar Sexo femenino Etnia	Edad Nacionalidad Latitud geográfica Coeficiente intelectual Nivel educativo Medio rural Dieta sin antioxidantes Actitud existencial	Depresión Menopausia Andropausia Hipertensión arterial Hipercolesterolemia Deficiencia vitamina B Obesidad Tabaquismo Traumatismo cerebral	Deterioro cognitivo leve Imagen cerebral Marcadores biológicos
<b>M E N O R</b>	APOE ε2, ε3	Nacionalidad Latitud geográfica Coeficiente intelectual Nivel educativo Medio urbano Dieta con antioxidantes Actitud existencial	Menarquía Hormonas Sexuales Normalidad presión arterial, colesterol, homocisteína, vitamina B12 y folatos	Memoria normal según edad

Información: Mayeux, 2008; Padala y cols, 2009; Reitz y cols, 2011.

Los estudios de incidencia confirman la preferencia de la afección por el género femenino, el cual presenta un riesgo relativo mayor de sufrir demencia y en particular de tipo Alzheimer (Yue y cols, 2005a; Gillies y McArthur, 2010). Las diferencias de frecuencia de la enfermedad respecto al sexo podrían estar vinculadas con variaciones en el metabolismo graso entre géneros o al efecto de los estrógenos en la EA (Walton y Dodd, 2007; Etgen, 2008).

### 1.1.2 APOLIPOPROTEÍNA E COMO FACTOR DE RIESGO GENÉTICO

La apolipoproteína E (APOE) constituye una de las principales lipoproteínas plasmáticas y es la que presenta mayor expresión a nivel cerebral. La síntesis de la APOE se da principalmente a nivel de células gliales ocurriendo escasamente a nivel neuronal. Posteriormente se secreta y su función es captar lípidos y colesterol de membranas neuronales dañadas (Bales y cols, 2009).

Hace casi 20 años se demostró la marcada asociación entre la EA de inicio tardío con la historia familiar positiva o sin ella y el status del gen de la APOE ε4 positivo. Actualmente la condición APOE ε4 positivo constituye el mayor factor de riesgo genético conocido de la EA (Itzhaki, 2004, Mahley y cols, 2006). El gen de la APOE se sitúa en el cromosoma 19q13 (ver

tabla 1.1) y posee tres alelos que codifican tres isoformas ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ , y  $\epsilon 4$ ). El alelo  $\epsilon 4$  positivo se encuentra sobre representado en los pacientes con Alzheimer y aparece entre un 32 a 58% de los casos de LOAD (Hartmann, 2006; Sando y cols, 2008); ya que entre un 42 a un 68% de los enfermos no son portadores del alelo  $\epsilon 4$  indica que otros factores genéticos y ambientales han de estar implicados en la forma de inicio tardío de la enfermedad.

Ser portador del alelo  $\epsilon 4$  del gen APOE aumenta de 2 a 5 veces el riesgo de sufrir Alzheimer y anticipa la edad de aparición de síntomas (Tanzi y Bertram, 2005). Este anticipo en la aparición de los síntomas también se presenta en pacientes portadores de mutaciones causales (EA familiar) que expresan el alelo  $\epsilon 4$ . Clínicamente se puede ser homocigoto ( $\epsilon 4 / \epsilon 4$ ) y no presentar la patología, aunque desde el punto de vista estadístico la presencia de dos alelos  $\epsilon 4$  casi asegura la patología para personas mayores de 80 años ya que se ha demostrado un aumento del riesgo en estos individuos de 15 veces. A su vez la presencia de los alelos  $\epsilon 2$  y  $\epsilon 3$  del mismo gen posee un efecto neuroprotector (ver tabla 1.2) (Hatters y cols, 2006; Sando y cols, 2008; Mohandas y cols, 2009).

Aunque la expresión de la APOE  $\epsilon 4$  se asocia a un mayor daño neurodegenerativo, un aumento en el deterioro cognitivo y las tres isoformas difieren en la asociación con el  $\beta$ - amiloide el mecanismo por el cual la APOE  $\epsilon 4$  está implicada en la patogenia de la EA no está del todo claro (Hartmann, 2006; Bales y cols, 2009; Citron, 2010). Variaciones en los residuos 112 y 158 de la proteína según la isoforma favorecen la interacción entre dominios terminales de la APOE  $\epsilon 4$  y la adquisición de una conformación que inestabiliza la proteína denominada glóbulo fundido; a la que se le atribuye la disfunción fisiológica (Jones y cols, 2011).

Dentro de las propiedades neurotóxicas con las que se ha relacionado la APOE  $\epsilon 4$  destacan: inhibición del crecimiento neurítico, alteración del citoesqueleto neuronal, estimulación de la fosforilación de la proteína Tau ( $\tau$ ) (Hoe y cols, 2006), disminución del aclaramiento y fomento de la agregación del péptido  $\beta$  – amiloide (Mahley y cols, 2006; Bales y cols, 2009). Como consecuencia de deficiencias en el transporte del colesterol puede disminuir la actividad  $\alpha$  - secretasa y aumentar la actividad de las secretasas  $\beta$  y  $\gamma$ , favoreciendo así la producción de  $\beta$  – amiloide (ver sección 1.8.7) (Kálmán y Janka, 2005).

### 1.1.3 OTROS FACTORES DE RIESGO GÉNÉTICO

La existencia de otros locus genéticos en los cromosomas 6, 9, 10 y 12 ha señalado existencia de otros genes que favorecen el posible desarrollo de la EA (Valdivieso y Bullido,

2002; Wang y Ding, 2008). Uno de ellos se localiza en el cromosoma 12 que codifica para la  $\alpha 2$  macroglobulina implicada en el aclaramiento de la proteína amiloide y presenta dos polimorfismos (Small y Mayeux, 2005; Mohandas y cols, 2009). Recientemente se ha podido correlacionar la susceptibilidad de desarrollar LOAD con variaciones en otros genes (Hollingworth y cols, 2011; Naj y cols, 2011).

La presencia del síndrome de Down puede considerarse como un factor de riesgo genético en la EA. Se ha observado que todas las personas con síndrome de Down presentan a nivel cerebral, lesiones características de la EA a edades entre los 35 y 40 años. Razón que versa en el cromosoma 21 extra copiado en el síndrome de Down, donde se ubica el gen que codifica para la APP (ver tabla 1.1) y para la  $\beta$  – secretasa, por lo que su expresión estará aumentada (Mori y cols, 2002; Wu y Zhang, 2009).

#### 1.1.4 FACTORES DE RIESGO NO GENÉTICO

Dentro de los factores de riesgo de la EA no genéticos, las condiciones premórbidas, la historia médica y el estilo de vida del individuo son importantes (ver tabla 1.2) (Llewellyn y cols, 2010). Estudios epidemiológicos apoyan la teoría de que la capacidad mental de la infancia y el nivel de escolarización disminuyen la probabilidad de sufrir demencia a edades avanzadas (Lazarov y cols, 2005; Riley y cols, 2005; Billings y cols, 2007) y aunque se desconoce de forma precisa los mecanismos biológicos subyacentes a tales observaciones, estudios recientes señalan que el aprendizaje favorece una disminución transitoria en la expresión de las subunidades Kv7.3 de los canales de potasio dependientes de voltaje (ver sección 3.4) a nivel de hipocampo y corteza perirrinal (Fontán-Lozano y cols, 2011).

A su vez se ha relacionado los traumatismos cerebrales con una mayor incidencia de EA debido a que éstos promueven la acumulación de  $\beta$  - amiloide (Blasko y cols, 2004; Mattson, 2004; Llewellyn y cols, 2010).

Los estudios que señalan una mayor incidencia de la EA en mujeres con deficiencia estrogénica post menopausia son contradictorios (Henderson, 2009; Henderson, 2010). No obstante se sigue acumulando evidencia que relaciona a las hormonas sexuales (17- $\beta$ -estradiol y testosterona principalmente) con una disminución del riesgo de sufrir EA. El efecto protector se ha asociado a diversas acciones como control de niveles del  $\beta$ - amiloide, regulación de la síntesis de APP, efecto antiinflamatorio y reducción especies reactivas de oxígeno (ROS) (Yue y cols, 2005a; Vegeto y cols, 2008; Henderson y Brinton, 2010).

El aporte de aspectos relacionados con el estilo de vida como: sedentarismo, el consumo alcohol, tabaquismo y patologías concomitantes como la hipertensión arterial; en la patogenia de la EA continúan siendo temas no claros la mayoría de los investigadores los consideran como factores que aumentan del riesgo de sufrir la enfermedad aunque al igual que con los otros factores de riesgo modificables su asociación positiva con el desarrollo de la EA no está confirmada (Adlard y cols, 2005; Peña y cols, 2006; Daviglus y cols, 2011; Neafsey y Collins, 2011).

La obesidad y la elevación de lípidos séricos se pueden considerar un factor de riesgo en la EA ya que el metabolismo lipídico se ha asociado al desarrollo de Alzheimer (ver tabla 1.2) (Blain y Poirier, 2004; Kivipelto y Solomon, 2006; Beel y cols, 2010; Xu y cols, 2011). El uso de estatinas en pacientes con hiperlipidemia o sin ella demostró una disminución en el riesgo de desarrollar demencia (Canevari y Clark, 2007; Wolozin y cols, 2007).

Existen datos que sugieren que una deficiencia funcional de diversas vitaminas como la vitamina B<sub>6</sub>, la cobalamina y el ácido fólico; así como una hiperhomocisteinemia ligera se asocian a una mayor incidencia de la EA (ver tabla 1.2).

La homocisteína produce microangiopatía cerebral, disfunción endotelial y contribuye al estrés oxidativo pudiendo aumentar la generación del péptido  $\beta$  - amiloide e inducir apoptosis. Por su parte el ácido homocistéico puede originar citotoxicidad por la estimulación de receptores NMDA. Estudios longitudinales determinan que la hiperhomocisteinemia incrementa el riesgo de padecer EA en la población adulta mayor, sin embargo la magnitud de esta contribución en la patogénesis de la EA no está del todo clara. Hay estudios que demuestran que modificaciones en el metabolismo de la homocisteína pueden alterar la regulación de la proteína Tau y la APP a nivel del sistema nervioso central (Sontag y cols, 2007).

La infección por parte de ciertos agentes se considera como un factor de riesgo en patologías neurodegenerativas, específicamente infecciones por virus neurotróficos de alta incidencia. Los virus de la familia del herpes son los que mayoritariamente se han relacionado con la enfermedad de Alzheimer, específicamente los tipos HSV -1 y HSV - 6 (Lin y cols, 2002; Itzhaki y Wozniak, 2006; Letenneur y cols, 2008). Propiedades como la afinidad por el sistema nervioso y la latencia de estos virus permite su detección cerebral en las zonas donde existe una gran afección en la EA. Se cree que el virus es capaz de localizarse a nivel cerebral debido a un descenso en la función inmunológica (Wozniak y cols, 2009).

Debido a la amplia distribución del HSV – 1 en la población general; se ha correlacionado su identificación con la presencia conjunta de la APOE  $\epsilon$ 4 como factor de riesgo. La presencia conjunta de ambos aumenta 12 veces la probabilidad de desarrollar la patología, con respecto a la presencia de uno solo de estos factores (Itzhaki y cols, 2008; Letenneur y cols, 2008).

A nivel molecular se han enunciado varios mecanismos mediante los cuales esta conjunción de factores favorece la aparición de la EA, como: el aumento del daño causado por el virus debido a la menor capacidad de reparación de la APOE  $\epsilon$ 4, la elevada capacidad de iniciar la cascada  $\beta$  – amiloide por ruptura de la glicoproteína B del HSV -1 y la inducción en la expresión de interleucina – 6 (IL-6) (Itzhaki y Wozniak, 2008).

## 1.2 PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Mecanismos celulares y moleculares que subyacen la patogenia de varios tipos de demencias han sido dilucidados y estudiados en los últimos años y aunque los cuatro tipos principales de demencia (degenerativa, infecciosa, vascular y metabólica) presentan características en común también poseen diferencias importantes (Small y Mayeux, 2005).

### 1.2.1 TEORÍA COLINÉRGICA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La etiopatogenia de la EA aún no está claramente establecida e históricamente se han planteado numerosas y diferentes hipótesis o teorías fisiopatológicas (Fuentes y Slachevsky, 2005; Peña y cols, 2006; Mohandas y cols, 2009). La teoría colinérgica fue la primera en ser enunciada. Considera que la EA es un proceso degenerativo primario capaz de dañar selectivamente grupos neuronales del hipocampo, complejo amigdalario y cerebro antero basal (Schaeffer y Gattaz, 2008). La teoría colinérgica del Alzheimer se fundamenta en que los cambios bioquímicos observados como la reducción del número de receptores funcionales de acetilcolina, guardan relación con los síntomas neurológicos y la gravedad de la enfermedad (Albuquerque y cols, 2009).

Este acercamiento establece que la disminución de los marcadores colinérgicos es proporcional a la densidad de las alteraciones neurofibrilares y a la severidad de la demencia; así como que el proceso degenerativo sería un evento primario, iniciándose en las neuronas colinérgicas del cerebro antero basal, específicamente en núcleo basal de Meynert y del septum

medial, ocasionando una disminución crítica en los marcadores colinérgicos (colina acetiltransferasa, acetilcolinesterasa) y el comienzo de las dificultades cognitivas (Schaeffer y Gattaz, 2008; Watanabe y cols, 2009).

Los principales hallazgos que han conducido a postular esta teoría son: la observación de que la administración de antagonistas muscarínicos no selectivos como la escopolamina, inducen un deterioro cognitivo similar al encontrado en pacientes adultos con demencia, favorecen la producción del péptido amiloide y disminuyen la actividad  $\alpha$  – secretasa (Liskowsky y Schliebs, 2006). Asimismo análisis inmunohistoquímicos *post mortem* en cerebros de pacientes con la EA, estudios de unión de [ $^3\text{H}$ ] – nicotina y estudios de neuroimagen utilizando [ $^{11}\text{C}$ ] – nicotina, refuerzan la teoría colinérgica (Ringman y Cummings, 2006; Wu y cols, 2010).

Sin embargo en la EA la relación observada entre el deterioro cognitivo y la disminución de la transmisión colinérgica no establece de forma definitiva una relación causal de la patología (Peña y cols, 2006).

### 1.2.2 TEORÍA DE LA CASCADA AMILOIDE

La teoría de la cascada amiloide es la que cuenta con la mayor aceptación en la actualidad, en ella se analiza el origen de la enfermedad de Alzheimer como una serie alteraciones en el procesamiento y secreción de la APP. Sin embargo bajo condiciones normales las transformaciones que sufre la APP se dan mayoritariamente por una vía no amiloidogénica (ver figura 1.3) (Mohandas y cols, 2009).

Investigaciones genéticas han puesto de manifiesto el gen FAD (*Familial Alzheimer Disease*) ubicado en la región centromérica del brazo largo del cromosoma 21, vinculado a la enfermedad de Alzheimer familiar de aparición precoz (Tanzi, 2006). Mutaciones en dicho gen conducen a un metabolismo alterado de la proteína de membrana APP, produciendo una mayor cantidad de péptido  $\beta$  – amiloide (Butterfield y Pocernich, 2005; Aisen, 2009). Debido a que la LOAD muestra casi las mismas alteraciones que la FAD estos descubrimientos ha servido de base para el desarrollo de la teoría amiloide (Funderburk y cols, 2010)

En esta teoría un desequilibrio entre la producción y el aclaramiento del  $\beta$ - amiloide es el evento desencadenante, central y responsable de las demás alteraciones observadas en la EA (Cummings y cols, 2007). El  $\beta$  - amiloide es el principal constituyente de las placas neuríticas, no obstante no está del todo claro cómo interactúa para formar placas, ni cuales etapas en la formación de placas, son críticas en el desarrollo de la EA (Santos-Torres y cols, 2007; Leão y

*cols*, 2011). El péptido amiloide también se deposita a nivel de los capilares cerebrales y meníngeos en pacientes con EA, sin embargo no se tiene certeza que los cambios vasculares tengan un rol definitivo en la patogénesis de la EA, sin embargo se postula que la angiopatía amiloide a nivel cerebral disminuye el suministro de oxígeno e induce la degeneración de los vasos (Racke y *cols*, 2005; Ropper y Brown, 2005; Marchesi, 2011).

El  $\beta$  - amiloide es un péptido con elevada resistencia a la degradación proteolítica, consta de entre 37 a 43 aminoácidos, tiene un peso aproximado de 4,5 KDa y sus isoformas 1-40 y 1-42 son las más frecuentes (Deane y *cols*, 2009). Entre ellas la isoforma 1-42 es menos abundante constituyendo entre un 5 y un 10% de la totalidad del péptido, mientras que aproximadamente el 90% restante está constituido por la isoforma 1-40 la cual presenta mayor solubilidad.

La isoforma 1-42 del péptido amiloide es la más hidrófoba y se considera como la que posee mayor toxicidad (ver figura 1.3) (Mohandas y *cols*, 2009). Debido a sus propiedades físicas es frecuente que adquiera la configuración de hoja plegada  $\beta$ , mostrando así mayor tendencia a la agregación y formación del núcleo de la placa amiloide (McGowan y *cols*, 2005; Bertram y Tanzi, 2008; Wu y Zhang, 2009).

El péptido  $\beta$  - amiloide se origina principalmente por el procesamiento de la APP a nivel de la membrana plasmática. La APP es una glicoproteína transmembrana de tipo I, la cual una vez sintetizada es transportada vía axonal hacia los terminales presinápticos (Mattson, 2004), donde que se localiza transitoriamente en la membrana plasmática con la mayor parte orientada hacia el espacio extracelular (Sweatt, 2010). Sin embargo es importante mencionar que la producción del péptido  $\beta$  - amiloide también ocurre en localizaciones intracelulares.

La porción carboxilo terminal de la APP se encuentra contenida dentro de la membrana celular, mientras que el extremo amino terminal se ubica en la zona extracelular (LaFerla, 2002). Se han identificado varias isoformas de la APP, las cuales dependen principalmente del procesamiento postrascriptcional (*splicing*).

La función específica de la APP se desconoce, sin embargo se sabe que su expresión se ve aumentada durante fenómenos de estrés celular. La existencia de varias hipótesis que sugieren la función de la APP la relacionan con: factor neurotrófico, molécula de adhesión, modulación de respuestas neuronales al ácido glutámico, transporte axonal, modulación de señales mediadas por calcio entre otras (Ashenafi, 2004; Goedert y Spillantini, 2006; Peña y *cols*, 2006).



La APP experimenta dos eventos proteolíticos los cuales pueden prevenir o favorecer la formación de péptidos amiloidogénicos éstos de mayor o menor toxicidad. Dichos eventos proteolíticos pueden ser modulados tanto por factores intracelulares como extracelulares entre los que destacan neurotransmisores, factores de crecimiento, citoquinas, hormonas y prostaglandinas (Slack y Wurtman, 2007).

El procesamiento normal de la proteína APP involucra una ruptura inicial realizada por enzimas con actividad  $\alpha$ -secretasa, principalmente enzimas pertenecientes a familia de las metaloproteasas-desintegrinas ADAM (ADAM 10, ADAM19, ADAM17, ADAM19) también conocidas como enzimas convertidoras del factor de necrosis tumoral (Slack y cols, 2001; De Strooper, 2010). Hasta la fecha no se conoce la identidad precisa ni la contribución específica de cada una de ellas en procesamiento de la APP a nivel de sistema nervioso central (De Strooper y cols, 2010).

La escisión producida por las  $\alpha$  – secretasas se produce entre los residuos 16 y 17 de la secuencia de lo que sería el péptido amiloide, conduciendo a la formación y liberación de un péptido de la porción amino terminal denominado APPs $\alpha$ , soluble bajo ciertas condiciones (Tanzi y Bertram, 2005) y un fragmento constituido por 83 aminoácidos de la porción carboxilo terminal (C83) (ver figura 1.3) (Lichtenthaler y Haass, 2004; Kojro y Fahrenholz, 2005). El APPs $\alpha$  se encuentra en menores cantidades en pacientes con EA (Sennvik y cols, 2000) y se ha asociado con funciones tróficas y neuroprotectoras (Puzzo y cols, 2008). Una vez producido el APPs $\alpha$  se secreta y se elimina del cerebro (Verdile y cols, 2004; Valera, 2006; Pákási y Kálmán, 2008).

El procesamiento de la APP por medio de las  $\alpha$  – secretasas puede ser modulado por la activación de diversas vías de señalización en las cuales intervienen varias quinasas como: la proteína quinasa C (PKC), la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA), la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K). La presencia de factores de crecimiento epidérmico, nervioso y de fibroblastos, la activación de receptores muscarínicos M1 y M3, receptores metabotrópicos de glutamato 1 y 5, receptores de serotonina tipo 2A, 2C y 4, receptor 1 de la hormona liberadora de corticotropina y del receptor 1 de adenilato ciclasa de la pituitaria favorecen un aumento en los niveles de APPs $\alpha$  (ver figura 1.3) (Slack y Wurtman, 2007; De Strooper y cols, 2010).

A nivel de la membrana la  $\gamma$  – secretasa produce una nueva ruptura en el segmento C83, a partir de esta división se produce el péptido p3 (conjunto de péptidos hidrofóbicos cortos  $\beta A_{17-40}$ ;  $\beta A_{17-42}$ ) (ver figura 1.3). Se conoce relativamente poco sobre la función y toxicidad del péptido p3. Debido a que no forma parte de las placas neuríticas se considera benigno, sin embargo debido a su baja solubilidad se ha identificado en placas difusas (De Strooper y cols, 2010).

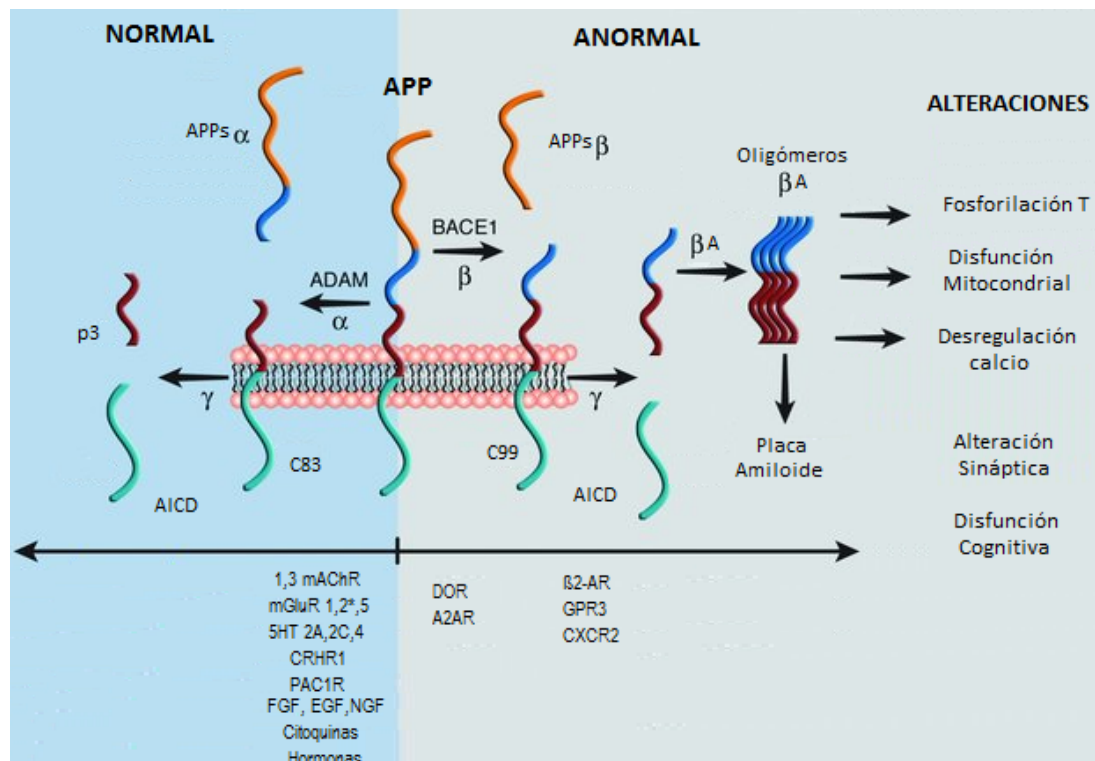
Al igual que en condiciones normales, en pacientes con Alzheimer el procesamiento de la APP se lleva a cabo por medio de una serie de rupturas. Inicialmente se produce una ruptura a nivel extracelular, más lejana al sitio de anclaje de la APP que la ocurrida en condiciones no amiloidogénicas (ver figura 1.3). Generando una porción amino terminal soluble más corta (APPs $\beta$ ) y un fragmento carboxilo terminal más largo con propiedades amiloidogénicas (C99) (Velliquette y cols, 2005; Siegel y cols, 2007). Esta escisión la realiza principalmente la BACE 1 ( $\beta$  – site – APP - cleaving enzyme) una proteasa transmembrana ubicua con actividad  $\beta$  – secretasa que se expresa predominantemente a nivel cerebral. Esta proteasa se localiza principalmente en el aparato de Golgi y los endosomas pero se traslada a la membrana celular donde ejerce efecto sobre la APP (Majercak y cols, 2006; Nishitomi y cols, 2006; McConlogue y cols, 2007; De Strooper, 2010). El procesamiento de la APP por medio de la BACE1 puede verse favorecido por la activación de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) como el receptor opioide  $\delta$  (DOR) (Teng y cols, 2010) y el receptor de adenosina  $A_{2A}$  ( $A_{2A}R$ ) (ver figura 1.3) (Rahman, 2009).

A su vez la expresión de la BACE1 puede verse modulada por situaciones comunes en las enfermedades neurodegenerativas y el envejecimiento como: estrés oxidativo, isquemia, inflamación hipoxia, trauma (Wen y cols, 2004; Velliquette y cols, 2005; Bourne y cols, 2007; Zhang y cols, 2007).

La identificación de una proteína homóloga a la BACE 1 denominada BACE 2 sugirió que la actividad  $\beta$ - secretasa fuera compartida, sin embargo su baja concentración cerebral y una reducida especificidad por el sitio de corte la han relegado a un segundo plano en el procesamiento cerebral de la APP (Johnston y cols, 2005; De Strooper y cols, 2010).

Seguidamente la  $\gamma$  – secretasa produce un corte en el sitio  $\gamma$  liberando el fragmento carboxiterminal denominado dominio intracelular de la APP (AICD) y produciendo un péptido de 40 ó 42 aminoácidos (péptido  $\beta$ -amiloide), el cual se secreta, agrega y acumula en placas extracelulares debido a su baja solubilidad (ver figuras 1.3 y 1.4) (Goedert y Spillantini, 2006). La

$\gamma$  – secretasa es capaz de procesar algunos sustratos en más de un sitio. Específicamente para la proteína precursora amiloidea el sitio  $\gamma$  se localiza cerca de los residuos 40-42, el sitio  $\epsilon$  cerca del residuo 49 y el sitio  $\zeta$  próximo al residuo 46 (Zhao y cols, 2004; Brunkan y Goate, 2005; Kametani, 2008).



**Figura 1.3 Procesamiento amiloidogénico y no amiloidogénico de la proteína precursora amiloidea (APP).** En la porción superior del esquema se ejemplifica las dos principales sendas en el procesamiento de la APP y los principales elementos involucrados, así como las principales alteraciones asociadas a la vía amiloidogénica de la APP. En la parte inferior del esquema se hace mención a posibles moduladores (activación receptores GPCRs, factores de crecimiento, citoquinas, hormonas) de cada actividad secretasa.  $\alpha$ : actividad  $\alpha$  secretasa,  $\beta$ : actividad  $\beta$  secretasa,  $\gamma$ : actividad  $\gamma$  secretasa, BACE1:  $\beta$  – site – APP – cleaving enzyme 1,  $\beta A$ : péptido  $\beta$ -amiloide, ADAM:  $\alpha$ -secretasa, APPs $\alpha$  y APPs $\beta$ : porciones solubles producidas luego del efecto de la  $\alpha$  y  $\beta$  secretasa respectivamente, C83: fragmento de 83 aminoácidos de la porción carboxilo terminal producido por efecto de la  $\alpha$  secretasa, C99: fragmento de 99 aminoácidos de la porción carboxilo terminal producido por efecto de la  $\beta$  secretasa, p3: péptido generado efecto de la  $\gamma$  secretasa, AICD: fragmento carboxiterminal denominado como dominio intracelular de la PPA, T: proteína Tau, mAChRs: receptores muscarínicos de acetilcolina, mGluR: receptores metabotrópicos de glutamato, 5HT: receptores de serotonina, CRHR1: receptor 1 de la hormona liberadora de corticotropina, PAC1R: receptor 1 de adenilato ciclasa de la pituitaria, FGF, EGF, NGF: factores de crecimiento de fibroblastos, epidérmico y nervioso respectivamente, DOR: receptor opioide  $\delta$ , A2AR: receptor de adenosina A 2A,  $\beta$ 2-AR: receptor adrenérgico  $\beta$ 2, GPR3: receptor 3 acoplado a proteína G, CXCR2: receptor 2 de quemoquina. Fuente: Modificado de Lichtenthaler y Haass, 2004.

La  $\gamma$  – secretasa involucrada en la segunda ruptura de la APP es una proteína de membrana tipo serpentina con propiedades enzimáticas (Sweatt, 2010), constituida por un complejo heteromérico de cuatro subunidades denominadas: presenilinas (PSEN1 y PSEN2),

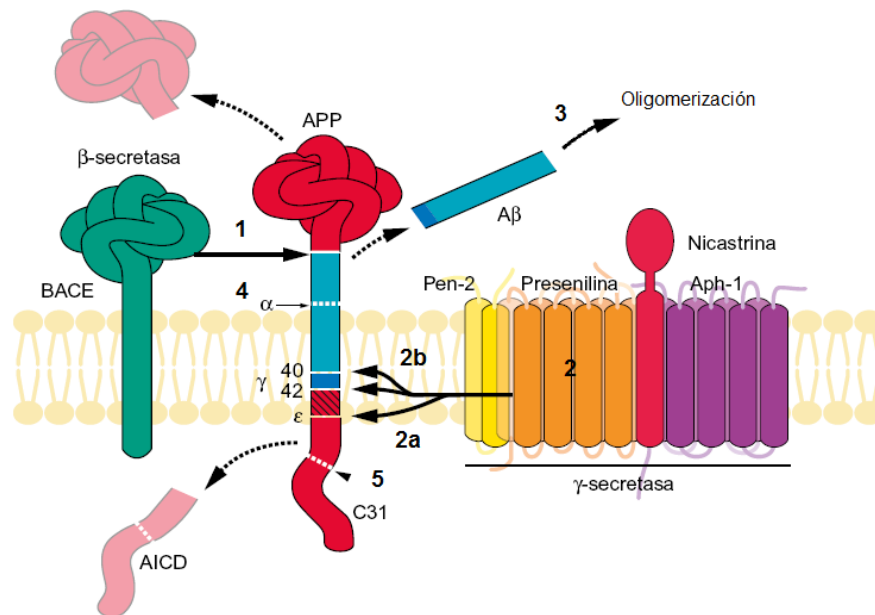
nicastrina (NCSTN), APH-1 de sus siglas en inglés *anterior pharynx defective phenotype* 1 (APH-1a y APH-1b) y PEN - 2 (*PS-enhancer -2*) (De Strooper, 2003). Donde cada una de estas subunidades se ha relacionado a función distinta (Wu y Zhang, 2009) y se ha observado que APH-1 inhibe la producción del péptido  $\beta$ -amiloide mientras que la PEN-2 lo favorece (Seo y cols, 2007; Uemura y cols, 2009).

Las cuatro subunidades que constituyen el complejo enzimático son necesarias para que éste ejerza su efecto sin embargo se ha demostrado que la subunidad de la presenilina es la que posee el sitio catalítico del complejo así como los sitios alostéricos de inhibición. Las otras subunidades específicamente la nicastrina, colaboran en la configuración, estabilización y maduración del complejo (Chavez-Gutiérrez y cols, 2008; Wu y Zhang, 2009; De Strooper y Annaert, 2010; Zhao y cols, 2010). Fosforilaciones específicas en alguna de las subunidades de la  $\gamma$  - secretasa y sitios específicos de la APP pueden promover ya sea la formación de isoformas amiloideas o no amiloideas (Siegel y cols, 2007; Chung, 2009). La estimulación del receptor adrenérgico  $\beta_2$  ( $\beta_2$ -AR), del receptor 3 acoplado a proteína G (GPR3) y del receptor 2 de quemoquina (CXCR2) favorecen la producción del péptido amiloide. Se ha propuesto que la estimulación de estos GPCRs modula la actividad de la  $\gamma$  - secretasa de diversas maneras (ver figura 1.3) (Thathiah y cols, 2009).

Durante el procesamiento de la PPA, el dominio C-terminal citoplasmático (AICD) puede ser transportado al núcleo, modular señales de calcio y estar implicado en la transducción de señales (De Strooper y Annaert, 2010; Ward y cols, 2010; Ohkawara y cols, 2011) Sin embargo esto no es del todo claro (Hebert y cols, 2006).

Al péptido  $\beta$  - amiloide se le han atribuido varias propiedades como: formación de complejos multiméricos, toxicidad neuronal a nivel sináptico, potencialización de la sensibilidad de las neuronas a toxinas, activación receptores de glutamato NMDA, formación de canales iónicos no selectivos a nivel de la membrana, disminución de la densidad de espinas dendríticas en neuronas del hipocampo, generación de especies reactivas de oxígeno, disminución de plasticidad sináptica de larga duración (LTP) y alteración de la homeostasis de  $Ca^{2+}$  llevando a un aumento intraneuronal del mismo (Shankar y cols, 2007; Bertram y Tanzi, 2008; Lauren y cols, 2009; Rafii y Aisen, 2009; Small, 2009; Blennow, 2011). Inclusive a dosis bajas se ha asociado el péptido amiloide con efectos beneficiosos a nivel de memoria y plasticidad sináptica (Puzzo y cols, 2008).

Los mecanismos fundamentales que subyacen a la toxicidad neuronal del  $\beta$  – amiloide son bastante complejos y no se conocen por completo (Peña y cols, 2006; Siegel y cols, 2007), sin embargo ha quedado de manifiesto que la secuencia de aminoácidos contenida entre las posiciones 25 y 35 es la que presenta mayor neurotoxicidad (Valera, 2006).



**Figura 1.4 Producción del péptido  $\beta$  – amiloide a partir de rupturas proteolíticas secuenciales de la proteína precursora amiloidea (APP).** En el diagrama se muestra la secuencia de etapas en el procesamiento de la APP hasta la formación de péptido  $\beta$ -amiloide y su oligomerización. Mediante números (1, 2a, 2b, 3, 4, y 5) se hace mención a sitios de intervención donde se puede modular la producción del péptido  $\beta$  – amiloide ( $A\beta_{1-42}$ ) con posible utilidad en terapéutica (ver sección 1.8).  $\alpha$ : sitio de corte enzima  $\alpha$  secretasa,  $\gamma$ : sitio de corte  $\gamma$  de la enzima  $\gamma$  secretasa,  $\epsilon$ : sitio de corte  $\epsilon$  de la  $\gamma$  secretasa BACE: enzima  $\beta$  secretasa,  $A\beta$ : péptido  $\beta$ -amiloide AICD: fragmento carboxiterminal denominado como dominio intracelular de la APP. Fuente: Adaptado Roberson y Mucke, 2006.

Las concentraciones del péptido  $\beta$  amiloide están determinadas por el balance entre la generación y el aclaramiento del mismo; en pacientes con la EA se reporta una alteración en el aclaramiento del péptido que conduce a la acumulación de éste a nivel cerebral (Wang y cols, 2006). El tránsito del  $\beta$  – amiloide a través de la barrera hematoencefálica está mediado por receptores, así el paso del péptido desde el cerebro hacia la sangre se da por la interacción con los receptores LRP-1 (*Lipoprotein receptor-related protein-1*) y por la acción de la glicoproteína p (Gp-p). Los LRP-1 son receptores endocíticos que pertenecen a la familia de los receptores de LDL y se expresan ampliamente a nivel cerebral. Este tipo de receptores poseen una función

primordial en el transporte y metabolismo del colesterol asociado a la apolipoproteína (Deane y cols, 2009).

Tanto el aumento de los niveles del  $\beta$  – amiloide como el envejecimiento conllevan a una disminución en la expresión de los receptores LRP-1. Una menor expresión de receptores o disfunción de los mismos conduce a una reducción en la salida del péptido amiloide del cerebro favoreciendo su acumulación.

La glicoproteína p puede favorecer la salida del  $\beta$ -amiloide al actuar como una bomba extrusora a nivel de la barrera hematoencefálica; sin embargo la magnitud de su efecto en la acumulación del péptido  $\beta$  – amiloide en pacientes con EA no se ha establecido con claridad (Wang y cols, 2006).

El tránsito del péptido  $\beta$ -amiloide hacia el cerebro a través de la membrana hematoencefálica (Chen y cols, 2007) también se produce a través de receptores, principalmente a través de los receptores de AGE (receptor de productos avanzados de glicación (RAGEs)). Los RAGEs constituyen un grupo de receptores pertenecientes a la familia de las inmunoglobulinas al que se pueden unir varios ligandos entre ellos, el péptido  $\beta$  – amiloide (Deane y cols, 2009). La expresión de los RAGEs está determinada por la concentración de sus ligandos y en contraste con la supresión en la expresión de los LPR-1s niveles elevados de  $\beta$  – amiloide a nivel cerebral conllevan un aumento en su expresión (Sevilla, 2008).

Ya que la interacción del RAGE con el  $\beta$  – amiloide origina: respuestas inflamatorias a nivel de endotelio, apoptosis de células endoteliales, disminuye del flujo sanguíneo cerebral y suprime la LTP; podría estar implicada en el desarrollo de las alteraciones neurovasculares observadas en la EA (McGeer y cols, 2006; Chen y cols, 2007; Origlia y cols, 2008; Aisen, 2009).

La degradación proteolítica del péptido  $\beta$  - amiloide se lleva a cabo principalmente por la neprilisina (NEP) y la enzima degradadora de insulina (IDE) metaloendopeptidasas dependientes de zinc. Determinaciones *in vitro* relevan que la plasmina también participa en la degradación del péptido amiloide (Iwata y cols, 2001; Eckman y Eckman, 2005; Tanzi y Bertram, 2005; El-Amouri y cols, 2008). Durante el envejecimiento y en pacientes con EA la expresión de la NEP y la IDE disminuye, ocasionando un aumento en la concentración del péptido  $\beta$ -amiloide a nivel cerebral (Wang y cols, 2006; Miners y cols, 2009). En pacientes con Alzheimer se observa una menor cantidad y actividad de la NEP principalmente a nivel de la corteza y el hipocampo, no así en otras regiones cerebrales.

A nivel cerebral la secreción de la IDE es regulada por la microglia y al igual que la NEP su distribución y concentración también muestra diferencias en pacientes con Alzheimer. Concentraciones menores se han identificado a nivel de corteza e hipocampo, donde la forma predominante presenta un mayor grado de oxidación (Caccamo *y cols*, 2005). En contraste la sobreexpresión del gen de NEP ó de IDE en ratones transgénicos para APP humano, genera una disminución del péptido amiloide a nivel cerebral, reduce la formación de placas y mejora el deterioro cognitivo (Leissring *y cols*, 2003; Mohandas *y cols*, 2009).

La vía endosomal lisosomal también constituye un regulador importante del procesamiento de la APP (Grbovic *y cols*, 2003; Pasternak *y cols*, 2004) y del metabolismo de la proteína tau (ver sección 1.2.3) (Funderburk *y cols*, 2010). Debido a la importancia de esta vía en el mantenimiento celular, estudios recientes sugieren que disfunciones en la autofagia neuronal reflejadas como un aumento en la cantidad y tamaño de los endosomas a nivel celular, pueden estar involucradas en la patogénesis de la EA (Komatsu *y cols*, 2006; Hara *y cols*, 2006; Boland *y cols*, 2008; Rusten y Simonsen, 2008). Ya que estas alteraciones ocurren antes de la aparición de placas seniles y ovillos neurofibrilares a nivel cerebral (Nixon, 2007; Boland *y cols*, 2008).

De la teoría amiloide surgen las razones por las cuales el péptido  $\beta$  – amiloide, su generación y metabolismo se han convertido en un blanco importante de investigación (Rafii y Aisen, 2009). Dentro de las estrategias antiamiloides se pueden mencionar: la inmunoterapia, inhibidores de  $\beta$ -secretasa, inhibidores de  $\gamma$ -secretasa, inhibidores de caspasa, estimulantes de la actividad  $\alpha$ -secretasa e inhibidores de la cascada amiloide como el uso de pequeñas moléculas capaces de alterar la formación de oligómeros de  $\beta$  – amiloide (ver sección 1.8) (Aisen *y cols*, 2006; Christensen, 2007).

Aunque el depósito de amiloide es un hecho casi invariable en la patogénesis de la EA algunos autores (Walsh y Selkoe, 2004) piensan que no es necesariamente la causa de la demencia.

### 1.2.3 LA PROTEINA TAU ( $\tau$ )

La teoría de la cascada amiloidea explica como la producción y acumulación del péptido  $\beta$  – amiloide puede iniciar el proceso patológico, sin embargo no expone claramente la totalidad de la etiopatogenia. En la hipótesis amiloide la proteína  $\tau$  surge como un evento patogénico

secundario que evidencia la subsecuente neurodegeneración (Fuentes y Slachevsky, 2005; Roberson y cols, 2007).

La  $\tau$  es una proteína altamente soluble que se asocia a los microtúbulos y su función en condiciones normales es estabilizarlos. Estos microtúbulos proveen soporte para cambios estructurales, crecimiento neuronal y transporte axonal (Goerdert y cols, 2006; Citron, 2010; Funderburk y cols, 2010).

En el sistema nervioso central la proteína  $\tau$  presenta 6 isoformas distintas que varían en el número de sitios de unión a los microtúbulos y de exones que poseen (Goedert y cols, 2006). En condiciones normales las acciones contrapuestas de las proteína quinasas y las fosfatasas modulan estos procesos de fosforilación. En la enfermedad de Alzheimer al igual que en otras patologías se produce una disfunción en los procesos de fosforilación de la proteína  $\tau$ , conduciendo a una hiperfosforilación de la misma.

La glicógeno sintasa quinasa  $3\beta$  (GSK- $3\beta$ ), la quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5), la serin/treonin quinasa de actividad dual (Dyrk 1A) y la MAPK1 son las principales proteína quinasas encargadas de fosforilar  $\tau$  cuya expresión y/o actividad se ve aumentada en la EA (Valera, 2006; Leroy y cols, 2007; Hanger y cols, 2009). Mientras que la actividad de las fosfoproteín fosfatasas (PPs) PP1, PP2A y PP5 se ve disminuida (Chung, 2009).

La glicógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) es un mediador del ciclo celular y comprende dos proteínas con un elevado grado de homología la GSK- $3\alpha$  y la GSK- $3\beta$ . La GSK- $3\beta$  también conocida como la Tau quinasa I es una serin/treonin quinasa dirigida por prolina que modifica la actividad proteica al agregar grupos fosfato a residuos de serina y treonina en respuesta a señales celulares. La GSK- $3\beta$  está involucrada en la regulación de una serie de procesos celulares y vías de señalización como: control metabólico, inflamación y apoptosis (Kitazawa y cols, 2008). También se relaciona con varias patologías como el trastorno bipolar y la EA (Balaraman y cols, 2006; Hooper y cols, 2008). Mientras que la GSK- $3\alpha$  se relaciona más con la regulación del sitio de corte de la APP favoreciendo la generación del  $\beta$  – amiloide (Piel y cols, 2003).

La Cdk5 o Tau quinasa II también es una serina/treonina quinasa dirigida por prolina cuya función principal es la modulación del desarrollo, estructura y la organización funcional del cerebro. A su vez participa en varias funciones cerebrales como: estabilización de microtúbulos, transporte de membrana y señalización de dopamina. Se ha observado que bajo condiciones neurotóxicas su activación es aberrante (Chung, 2009).



La Dyrk 1A fosforila gran cantidad de sustratos que poseen funciones fundamentales como: factores de transcripción y factores de iniciación de la síntesis proteica. Ya que el gen que codifica para esta quinasa se encuentra en el cromosoma 21 su expresión se ve aumentada en el síndrome de Down. Por su parte la sobreexpresión de la Dyrk 1A favorece: la hiperfosforilación de la  $\tau$ , la elevación de niveles de  $\beta$  – amiloide así como deficiencias en la memoria y el aprendizaje (Ahn *y cols*, 2006; Ryoo *y cols*, 2007).

La proteína  $\tau$  hiperfosforilada presenta una agregación aberrante con las proteínas del citoesqueleto específicamente muestra una menor interacción con los microtúbulos. Lo que favorece el aumento de tau libre que conlleva una mayor agregación y fibrilización de la misma con la consecuente inhabilitación del transporte axonal (Kuret *y cols*, 2005; Rafii y Aisen, 2009).

Son numerosas las evidencias que señalan las modificaciones de la proteína  $\tau$  junto con los oligómeros de  $\beta$  – amiloide como los principales mediadores de la disfunción neuronal en la patogénesis de la EA (Gong *y cols*, 2005; Stoothoff y Johnson, 2005; De Strooper, 2010). Así los ovillos neurofibrilares que inicialmente se observan en la corteza entorrinal y el hipocampo posteriormente se extienden a la amígdala y a zonas corticales (temporal, frontal y parietal) (Goedert y Spillantini, 2006; Rafii y Aisen, 2009; Wright, 2009).

#### 1.2.4 CONTRIBUCIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se consideran como productos normales del metabolismo y su principal fuente es el proceso de fosforilación oxidativa a nivel mitocondrial. Sin embargo, cuando existe un desbalance entre la producción de especies reactivas y la capacidad celular de neutralizar dichas especies ocurre lo que se denomina estrés oxidativo (EO) (Marchesi, 2011).

El estrés oxidativo tiene un papel fundamental en el mecanismo fisiopatológico de muchas enfermedades neurodegenerativas, ya que es capaz de dañar gran cantidad de moléculas y organelas celulares como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. El EO es capaz de aumentar la permeabilidad de la mitocondria conduciendo a la muerte celular por necrosis ó apoptosis (Dong *y cols*, 2009).

En la EA el péptido amiloide por un mecanismo que involucra necesariamente la activación de los receptores NMDA es capaz de favorecer la formación de especies reactivas de oxígeno. Situación que favorece la aparición de las alteraciones observadas alrededor de las

placas de  $\beta$  – amiloide y de los ovillos neurofibrilares (Butterfield y cols, 2001; De Felice y cols, 2007).

### 1.3 CALCIO Y LA PATOLOGÍA NEURONAL

El ión calcio constituye un segundo mensajero de gran importancia a nivel celular (ver sección 3.1.3), es el mediador más común a nivel neuronal sin embargo la acumulación excesiva del mismo es tóxica (Schulman y Roberts, 2008) y se ha asociado al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas y a muerte neuronal (Hagenston y cols, 2009; Wang y Sun, 2010). La capacidad de mantener una adecuada concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel del retículo endoplásmico (RS) se ve disminuida en neuronas envejecidas (Wang y Sun, 2010), en la EA familiar y en presencia de mutaciones en los genes que codifican para la presenilina (Green y cols, 2007).

El  $\text{Ca}^{2+}$  se intercambia continuamente entre el citosol y la luz del RS. Si a nivel de retículo endoplasmático se produce una disminución de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por bloqueo o disfunción del sistema de transporte aumenta la concentración de calcio a nivel del citosol y la célula entra en apoptosis (Small, 2009). Se ha observado que alteraciones en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  celular se encuentran relacionadas con la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer. Ya que el calcio estimula la producción y el metabolismo de proteínas asociadas a la patología como el péptido  $\beta$  – amiloide y la proteína  $\tau$  (Stutzmann y cols, 2004; Green y LaFerla, 2008).

### 1.4 NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA

Tanto la acetilcolina como el glutamato son los dos principales neurotransmisores relacionados con la memoria y el aprendizaje, por lo que alteraciones en éstos procesos y en otras funciones cognitivas observadas en la EA podrían estar estrechamente asociadas a un malfuncionamiento de la actividad glutamatérgica (Yajeya y cols, 2000; Santos-Torres y cols, 2007; Dong y cols, 2009).

La hipótesis glutamatérgica establece una relación entre la teoría colinérgica de la EA y la transmisión glutamatérgica (ver sección 3.0) (Dong y cols, 2009). En la hipótesis glutamatérgica la acetilcolina y sus receptores, principalmente los  $(\alpha 7)_5$  se consideran como neuroprotectores ya que modulan la excitabilidad neuronal mediada por glutamato, por lo que ambos sistemas de neurotransmisión interactúan de forma importante (Geerts y Grossberg,

2006; Lin y cols, 2010). En la EA las alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica se observan inicialmente a nivel de la región entorrinal, seguida por variaciones en el hipocampo, amígdala, corteza parietal y corteza frontal (Mohandas y cols, 2009).

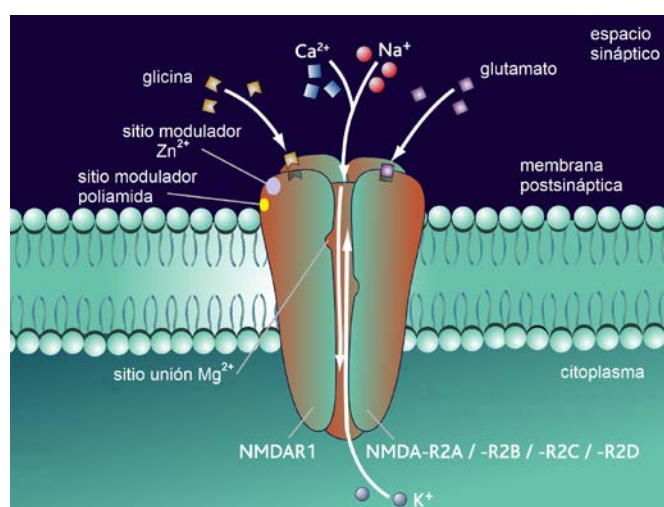
A partir de estudios farmacológicos y electrofisiológicos se han clasificado los receptores de glutamato en dos grupos distintos: ionotrópicos y metabotrópicos (mGluRs). Los receptores ionotrópicos son canales iónicos selectivamente permeables a distintos cationes que se dividen en tres grupos de acuerdo a sus agonistas selectivos: N-metil-D-aspartato (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidroxi 5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) y kainato (Danysz y Parsons, 2003). Por lo general estos dos últimos se engloban en una categoría común (AMPA/kainato). Por su parte los receptores metabotrópicos son receptores acoplados a proteína G (ver sección 3.2) (Valera, 2006).

Los receptores de glutamato tipo NMDA son los que presentan mayor expresión nerviosa y la región CA1 del hipocampo es la que posee mayor densidad. Estructuralmente son canales iónicos que se abren al activarse por el ligando fisiológico glutamato ó por NMDA. Están constituidos por una subunidad principal NMDAR1 y cuatro subunidades adicionales (NMDA-R2A, NMDA-R2B, NMDA-R2C y NMDA-R2D). La subunidad NMDAR1 le confiere al receptor varias de sus propiedades como: bloqueo por  $Mg^{2+}$  de forma dependiente del voltaje, alta permeabilidad a  $Ca^{2+}$ , respuestas específicas a varios agonistas y antagonistas, inhibición por  $Zn^{2+}$  y activación por poliamidas (Valera, 2006).

El canal conformado por estas cinco subunidades posee una elevada conductancia y poca selectividad iónica, por lo que permite el paso de iones  $Na^{+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $K^{+}$  (ver figura 1.5). Para que el canal se abra requiere la presencia de glicina como coagonista y la despolarización producida por el mismo glutamato al activar receptores AMPA y kainato. Esta despolarización provoca la salida rápida del  $Mg^{2+}$  del canal NMDA, que ocluye el poro en reposo y permite que el glutamato active el receptor NMDA favoreciendo la entrada de  $Ca^{2+}$  en la neurona postsináptica (De los Ríos y cols, 2002).

La neurotransmisión glutamatérgica fisiológica en hipocampo produce una señal citosólica de calcio, que dura pocos milisegundos y media fenómenos de plasticidad sináptica tipo potenciación de larga duración en el hipocampo (LTP) que favorece el aprendizaje y la consolidación de la memoria (Lynch, 2004). Sin embargo una elevación sostenida de iones calcio, sodio y cloruro producto de una hiperactivación de los receptores NMDA de glutamato se han asociado a una despolarización excesiva de la membrana postsináptica, aparición de

procesos neurodegenerativos y muerte celular (Beck y cols, 2003; Friedman, 2006; Szado y cols, 2008). De la misma forma un aumento del calcio intraneuronal consecuencia de una neurotransmisión glutamatérgica disfuncional puede generar una depresión de larga duración en cerebelo (LTD), con sobrecarga de calcio en la mitocondria, activación de la síntesis de óxido nítrico, generación de radicales libres, iniciación de la apoptosis y muerte neuronal (Fan y Raymond, 2007; Navarro y Boveris, 2007; Jung y cols, 2009; Ndountse y Chan, 2009).



**Figura 1.5 Receptor de glutamato tipo NMDA.**  $\text{Ca}^{2+}$ : iones calcio,  $\text{Na}^+$ : iones sodio,  $\text{Zn}^{2+}$ : iones zinc,  $\text{Mg}^{2+}$ : iones magnesio, NMDAR1: subunidad principal del receptor NMDA de glutamato, NMDA-R2A, -R2B, -R2C y -R2D: subunidades adicionales del receptor NMDA de glutamato. Fuente: Adaptado del banco de imágenes del Lundbeck Institute, 2010. Reproducida bajo permiso Lundbeck Institute.

Experimentalmente la incubación de las neuronas con glutamato favorece el depósito de filamentos similares a los ovillos neurofibrilares observados en la enfermedad de Alzheimer. Asimismo la exposición de cultivos neuronales a  $\beta$ -amiloide favorece la neurotoxicidad inducida por glutamato y regula la expresión de receptores NMDA a nivel de membrana (Snyder y cols, 2005; Parameshwaran y cols, 2008).

A nivel sináptico no hay enzimas encargadas de la degradación del glutamato, los transportadores de glutamato a nivel neuronal y de glia, son los que recaptan el exceso de glutamato (Butterfield y Pocernich, 2005). En la EA la inhibición del transporte presináptico y glial de glutamato (Doraiswamy, 2002), la reducción en la actividad de la enzima que convierte glutamato a glutamina denominada glutamina sintetasa (Walton y Dodd, 2007), la despolarización discreta de las neuronas y la estimulación de la producción del óxido nítrico por

parte del  $\beta$  – amiloide (Mohandas y cols, 2009) favorecen la presencia prolongada de glutamato extraneuronal y por ende la continua estimulación de receptores (Butterfield y Pocernich, 2005; Wenk, 2006).

La muerte de neuronas corticales incubadas con glutamato puede prevenirse incorporando antagonistas no competitivos del receptor NMDA. Sin embargo antagonistas con elevada afinidad por el receptor provocan deterioro cognitivo al impedir las señales rápidas implicadas aprendizaje y la consolidación de la memoria (Lofwall y cols, 2006; Wenk, 2006). Otros como la memantina al poseer una baja afinidad por el canal y una importante dependencia de voltaje, ocupan rápidamente el canal durante la despolarización y lo abandonan de la misma manera durante la repolarización. Bloqueando el canal solo bajo condiciones patológicas de excitotoxicidad (Roberson y Mucke, 2006). La memantina a su vez presenta actividad antioxidante y aumenta la producción del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Sonkusare y cols, 2005).

En pacientes con EA moderada la memantina es el medicamento de elección, el cual puede añadirse una terapia existente con inhibidores de la acetilcolinesterasa (Robinson y Keating, 2006; Citron, 2010). El uso de concomitante de memantina con inhibidores de la acetilcolinesterasa es frecuente y reduce los posibles efectos adversos de los inhibidores de la acetilcolinesterasa sin embargo la efectividad clínica de esta combinación es modesta (Roberson y cols, 2007).

## 1.5 LESIONES CEREBRALES EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Las lesiones cerebrales observadas en las autopsias de pacientes con EA confirman el diagnóstico. Estas lesiones son de dos tipos principales: placas de amiloide y depósitos intracelulares. Los depósitos intracelulares se conocen como ovillos neurofibrilares y están formados por filamentos helicoidales emparejados que contienen ubiquitina, proteína  $\tau$  hiperfosforilada y filamentos del citoesqueleto (Sweatt, 2010). Inicialmente los ovillos neurofibrilares aparecen a nivel de la corteza entorrinal desde la cual se extienden al hipocampo y neocorteza. Los ovillos neurofibrilares se pueden encontrar también en los procesos neuríticos y en otras patologías como la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica (Goedert y Spillantini, 2006; Wu y Zhang, 2009; Citron, 2010).

La placa de amiloide es un agregado fibroso extracelular e insoluble compuesto principalmente de  $\beta$ -amiloide. En la EA existen tres formas principales de placas de amiloide:

neuríticas, difusas y algodonosas. Las placas neuríticas son las lesiones clásicas descritas como placas seniles en la EA; constituyen afecciones microscópicas esféricas que se observan más fácilmente por medio de tinción de Bielschowsky. Presentan un centro de proteína amiloide rodeado por terminaciones axonales agrandadas denominadas neuritas distróficas y componentes inflamatorios (Fuentes y Slachevsky, 2005, Small y Mayeux, 2005; Zotova *y cols*, 2010). Las placas neuríticas se distribuyen en la capa molecular del giro dentado, la amígdala, la corteza de asociación del lóbulo frontal, el lóbulo parietal y en los núcleos más internos que proyectan a todas estas regiones (Selkoe, 2008).

El proceso inflamatorio observado en la EA se asocia a un aumento en los niveles de citoquinas presente en las enfermedades neurodegenerativas y durante el envejecimiento; el cual se atribuye a la capacidad del  $\beta$  – amiloide de activar la microglia y los astrocitos (Bodles y Barger, 2004; Wyss-Coray, 2006; Mohandas *y cols*, 2009).

La activación de la microglia provoca: una mayor expresión del complejo de histocompatibilidad a nivel celular, estimulación de la expresión de la óxido nítrico sintasa y aumento de la secreción de citoquinas proinflamatorias, del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y otros mediadores del proceso inflamatorio. A su vez y en contraposición a lo mencionado anteriormente el  $\beta$  – amiloide es capaz de promover su aclaramiento al favorecer la fagocitosis de la microglia.

Por su parte los astrocitos se agrupan alrededor de los depósitos de  $\beta$  – amiloide y segregan interleucinas, prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, factores de la coagulación e inhibidores protéicos (Ballatore *y cols*, 2007; McGeer y McGeer, 2007; Amor *y cols*, 2010).

Las placas difusas de amiloide son depósitos que tienen una apariencia porosa, poco compacta y/o granular, que principalmente se observan en la corteza límbica, el estriado y el cerebelo. Este tipo de placas de amiloide es el más frecuente en adultos sanos y generalmente se presenta sin el componente inflamatorio. Las placas algodonosas son las mayor tamaño y se observan principalmente en pacientes con mutaciones en el gen de la presenilina 1 (Dumanchin *y cols*, 2006).

Aunque las placas seniles constituyen las lesiones clásicas en la EA, la severidad de la demencia presenta una mayor correlación con la pérdida de las sinapsis debido a la muerte neuronal en localizaciones específicas y con el número de ovillos neurofibrilares (McGowan *y cols*, 2006; Gómez-Isla, *y cols*, 2008; Hanger *y cols*, 2009). También es posible establecer una correlación estrecha entre el deterioro cognitivo observado y la cantidad de  $\beta$  – amiloide

oligomérico no incorporado a placas seniles, principalmente en forma de dímeros y trímeros (Gong *y cols*, 2003; Walsh y Selkoe, 2007; Hung *y cols*, 2008; Roychaudhuri *y cols*, 2009).

La muerte neuronal y la disminución del número de sinapsis en la EA así como el aumento en la acumulación de placas neuríticas y de ovillos neurofibrilares se observa en los lóbulos frontal, temporal, y parietal (Sambamurti *y cols*, 2009). Siendo las zonas que muestran una mayor afectación aquellas estrechamente relacionadas con la memoria y el aprendizaje como las regiones CA1 y CA2 del hipocampo, la corteza entorrinal, el subículo y la amígdala (Gómez-Isla *y cols*, 2008).

## 1.6 AFECTACIÓN COLINÉRGICA CEREBRAL EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Durante el envejecimiento el sistema colinérgico experimenta una serie de cambios que incluyen una disminución en la capacidad de unión de receptores nicotínicos a nivel de la corteza frontal y del cuerpo estriado (Nordberg, 1994; Perry *y cols*, 2000; Sabbagh *y cols*, 2006; Schliebs y Arendt, 2006). En la EA también se producen una serie de alteraciones en los sistemas de neurotransmisión, siendo el más afectado el colinérgico seguido por el glutamatérgico (ver sección 1.4) y por último el GABAérgico (Peña *y cols*, 2006; Thathiah y De Strooper, 2011).

Biopsias de pacientes con aproximadamente 42 meses de evolución evidencian una reducción importante en la neurotransmisión colinérgica y afectaciones en la sinapsis glutamatérgica (Wenk, 2006). Aspectos que se relacionan con el deterioro cognitivo observado durante este periodo. En este lapso también se observa una alteración en la transmisión noradrenérgica y serotoninérgica, no así en la GABAérgica o dopaminérgica (Schaeffer y Gattaz, 2008).

La afectación en la neurotransmisión colinérgica cerebral en la EA no es uniforme. Estudios neuroquímicos revelan la disminución de varios marcadores del sistema colinérgico a nivel de la corteza temporal, hipocampo, amígdala y corteza entorrinal (Watanabe *y cols*, 2009; Wu *y cols*, 2010). Reducción que se presenta principalmente en la actividad de la colina acetiltransferasa, en la síntesis y liberación de la acetilcolina (Wenk, 2006) y la capacidad de unión de los receptores nicotínicos; la cual se ve afectada como consecuencia de un defecto en síntesis, transcripción, traducción, transporte y modificación post trasduccional de los receptores

(Guan y cols, 2000; Sabbagh y cols, 2006). Sin embargo existen zonas como el tálamo donde se evidencia una elevada conservación (Mesulam, 2004).

Como se mencionó anteriormente la disminución en la capacidad de unión de los receptores nicotínicos constituye junto con la disminución de la actividad de la colina acetiltransferasa los dos hallazgos más consistentes en pacientes con Alzheimer. A su vez el uso de anticuerpos anticolinesterasa ponen de manifiesto el aumento en la degradación de la ACh mediada por la acetilcolinesterasa y la butirilcolinesterasa (Ellis y cols, 2006; Wenk, 2006; Albuquerque y cols, 2009).

Es claro que en la EA se observa inicialmente una disminución en el número de receptores nicotínicos y una afectación posterior de los receptores muscarínicos, sin embargo se debe destacar la variabilidad en la magnitud y los subtipos afectados según la región cerebral. (Hellstrom-Lindahl y cols, 1999; Ellis y cols, 2006, Albuquerque y cols, 2009).

En términos generales en la EA se presenta una disminución en el número y densidad de receptores nicotínicos, siendo el subtipo  $\alpha 4\beta 2$  el más afectado. La expresión de las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  y  $\alpha 7$  de los receptores nicotínicos a nivel de corteza e hipocampo también se ven reducidas. Lo que contribuye a explicar el descenso observado en la capacidad de unión del agonista por los receptores que expresan la subunidad  $\alpha 7$  a nivel de hipocampo y por los  $\alpha 4\beta 2$  corticales (Ellis y cols, 2006). Alteraciones en las distintas subunidades de los receptores nicotínicos se relacionan con el aumento del péptido amiloide, la extensión de placas neuríticas y la magnitud de la taupatía (Schaeffer y Gattaz, 2008).

Estudios neuroquímicos, biopsias y autopsias proporcionan datos discordantes según la alteración de los subtipos de receptores muscarínicos durante el envejecimiento y la EA. En parte debido a la escasez de trazadores o ligandos específicos para los distintos subtipos (ver sección 3.2) (Thomas y cols, 2008; Avlani y cols, 2010). Existe controversia si la reducción de la capacidad de unión de los receptores muscarínicos observada en estudios *in vivo*, se debe a cambios específicos en la afinidad – actividad del receptor, a la pérdida de neuronas en estadios avanzados de la EA o a una entrega disminuida del trazador a la zona debido a una baja en el flujo sanguíneo. Aspectos que podrían reflejar una disminución de los sitios de unión, no debida a una limitación en la expresión proteica. A su vez, factores intrínsecos del ligando utilizado como metabolismo, exclusión cerebral y unión no selectiva pueden generar discrepancias (Boundy y cols, 2005; Schaeffer y Gattaz, 2008, Thinschmidt y cols, 2008).



## 2.0 EL HIPOCAMPO

Anatómicamente el hipocampo junto con el giro parahipocampal y el cíngulo forman parte de lo que Broca denominó en 1930 el lóbulo límbico (Lorente de Nó, 1934), caracterizada por ser una estructura cerebral con un doblez de gran tamaño en forma de arco. El hipocampo es una organización que se encuentra muy relacionada con la corteza cerebral considerándose una invaginación de la arquicorteza, producida por la formación de la fisura del hipocampo la cual retrae la arquicorteza formando una prominencia en el piso del cuerno inferior. Se localiza inserto en el giro parahipocampal en el interior del lóbulo temporal y junto al giro dentado y al subículo componen la formación hipocampal (ver figura 1.6) (Waxman, 2009).

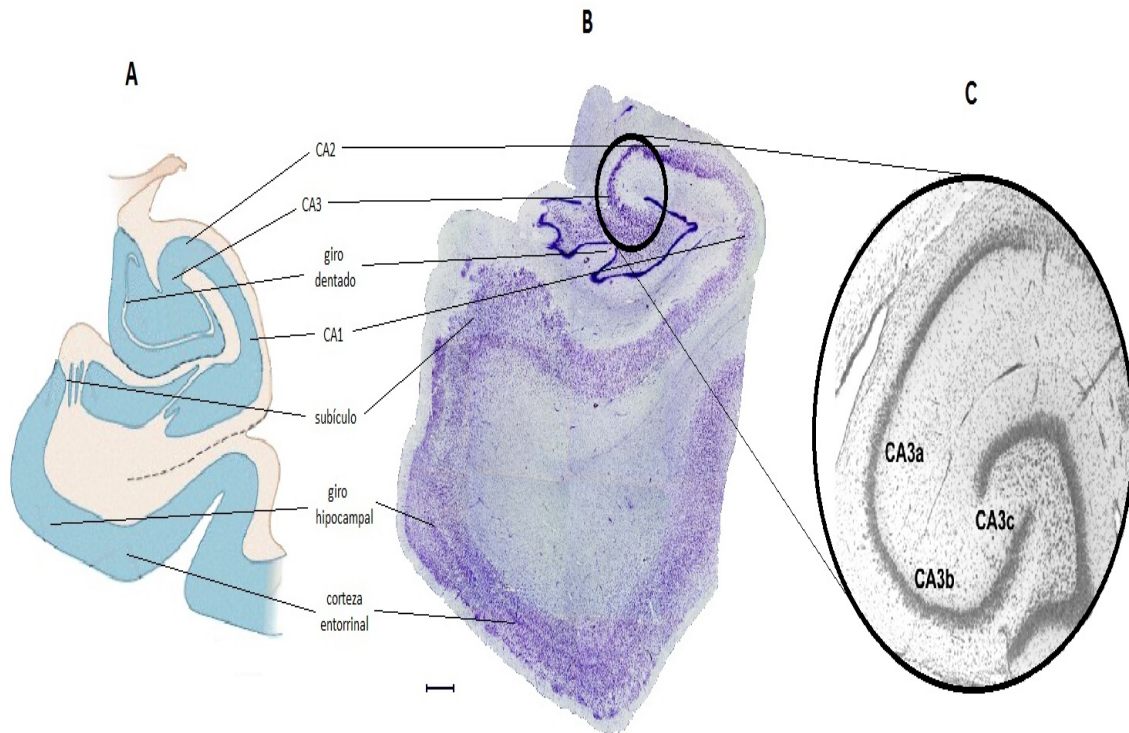
El giro dentado está constituido por una rotación de la corteza que se extiende formando el giro fasciolar y el inducio gris sobre el cuerpo calloso. El subículo por su parte constituye la zona del giro parahipocampal donde descansa el hipocampo. Tanto el giro dentado como el hipocampo conservan propiedades de una corteza primitiva con tres capas o estratos celulares definidos, donde la capa celular se localiza entre dos capas plexiformes (Nieuwenhuys y cols, 2008). A nivel del subículo se produce la transición a una corteza con seis capas definidas. Este cambio se produce específicamente en la mesocorteza transicional la cual se puede dividir en dos zonas la periarquicortical o zona límbica y la proneocortical o zona paralímbica (Witter y cols, 1989; Lopes da Silva y cols, 1990).

El giro dentado tiene forma de "V" y los estratos moleculares de la porción más externa a la más interna se denominan: capa molecular, capa granular y la capa polimórfica (Amaral y Lavenex, 2007). La capa granular o celular es característica y está constituida por una gran cantidad de somas pertenecientes a pequeñas neuronas excitables o células granulares cuyo principal neurotransmisor es glutamato.

El subículo se localiza entre el hipocampo y el presubículo, histológicamente se divide en una capa molecular superficial ancha y una capa piramidal profunda con varias subcapas. El subículo recibe proyecciones de la región CA1 adyacente, se proyecta a la corteza entorrinal y a otras estructuras subcorticales como: septum, núcleo accumbens, tálamo anterior, hipotálamo y el núcleo mamilar; convirtiéndolo en la principal vía de salida del hipocampo (Insausti y Amaral, 2004).

El presubículo, parasubículo y la corteza entorrinal se encuentran al lado del subículo y en ellos se distinguen dos capas separadas entre sí por una lámina carente de células. En el caso de la corteza entorrinal las capas principales interna y externa a su vez se subdividen

(Johnston y Amaral, 2004). Debido a que el presubiculo, el parasubiculo, y la corteza entorrinal, se encuentran interconectadas y relacionadas íntimamente con la formación hipocampal normalmente se consideran componentes de la misma (Amaral y Lavenex, 2007).



**Figura 1.6** Corte coronal de la formación hipocampal humana y estructuras relacionadas. **A.** Representación esquemática Fuente: Adaptado Waxman, 2009. **B.** Microfotografía teñida con el método de Nissl Barra de escala: 1000  $\mu$ m Fuente: Adaptado Kastanauskaite, 2009. **C.** Microfotografía de rodaja cerebro con subregiones de CA3 Fuente: Adaptado Kubota y cols, 2003.

En el ser humano la longitud anteroposterior del hipocampo de 3,5 a 4 cm constituyendo el segmento de mayor tamaño de la formación hipocampal. Presenta una coloración amarillo claro debido a la capa subependimal fibrosa denominada alveo que contiene fibras mielinizadas de axones pertenecientes a células piramidales. El empaquetamiento de estas fibras da origen a la fimbria, la cual posteriormente forma los pilares del fórnix. El fórnix junto con el fascículo mamilar y el cíngulo componen los principales sistemas que ligan la formación hipocampal con otras estructuras cerebrales como el hipotálamo (Kastanauskaite, 2009).

Las neuronas piramidales son los principales constituyentes celulares del hipocampo, representan entre un 70 y 85 % de la población neuronal total y constituyen la mayoría de las células de proyección. Neuronas no piramidales de naturaleza excitatoria como las células granulosas del giro dentado y células musgosas en la región hilar también se observan a nivel hipocampal.

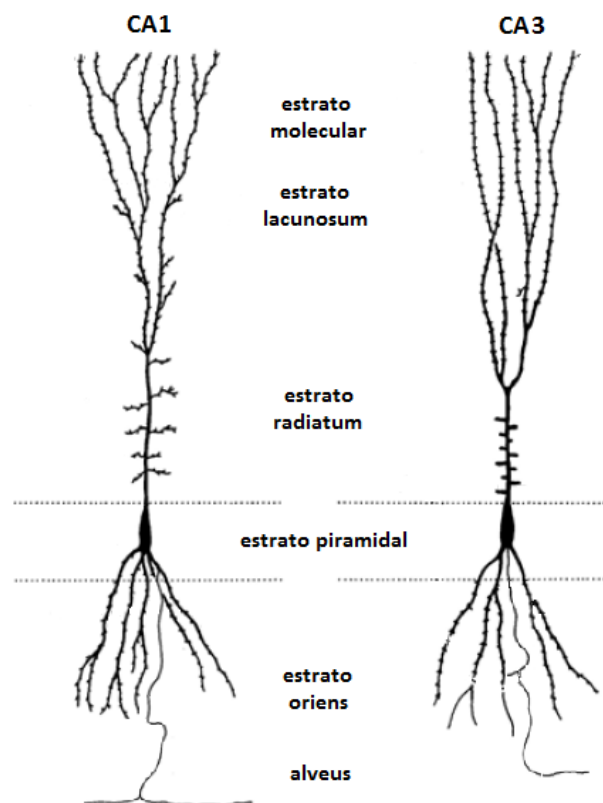
La gran superficie somatodendrítica así como la morfología característica de su soma a la cual se le atribuye su denominación, son propiedades típicas de las neuronas piramidales. Los cuerpos celulares de estas neuronas constituyen los elementos centrales de la capa media del hipocampo o estrato piramidal. Cada neurona piramidal posee más de un árbol dendrítico, generalmente uno apical y uno ó más latero basales. Los cuales son bastante complejos y excepto los 10 a 20  $\mu\text{m}$  proximales se encuentran cubiertos de espinas dendríticas (Alonso-Nanclares y cols, 2004).

La dendrita apical surge del soma, se orienta hacia la corteza, penetra el estrato radiatum (*stratum radiatum*) y se divide. Las ramificaciones de esta dendrita se localizan en el estrato lacunosum (*stratum lacunosum*) y el estrato molecular (*stratum moleculare*) (ver figura 1.7). Las dendritas latero basales de las neuronas piramidales generalmente son radiales al soma y las ramificaciones se presentan a distancias cercanas al cuerpo celular, localizándose en el estrato polimorfo o estrato oriens (*stratum oriens*). El axón de las neuronas piramidales surge directamente desde el soma o bien de la parte proximal de una dendrita basal, proyecta a larga distancia y da lugar a una arborización axónica intracortical (Amaral y Lavenex, 2007).

Diferencias en el tamaño y la densidad de embalaje de las neuronas piramidales posibilitan la división del hipocampo en secciones denominadas CA1, CA2 y CA3 (Insausti y Amaral, 2004). La capa piramidal de la región CA1 se encuentra adyacente al subículo y presenta la mayor densidad de somas. Por su parte la región CA2 es bastante estrecha, se localiza entre CA1 y CA3, y en ella convergen propiedades de las otras regiones. Por lo que generalmente las comparaciones se establecen entre las zonas CA1 y CA3 (Amaral y Lavenex, 2007).

La región CA3 del hipocampo localiza en la región hilar del giro dentado (ver figura 1.6) y las neuronas piramidales de esta región presentan variaciones en morfología y asociación. Lo que permite una subdivisión en CA3a, CA3b y CA3c (ver figura 1.6). Siendo la subregión CA3a la más próxima a la región CA1 y la CA3c la más cercana al hilus (Spruston y McBain, 2007; Hemond y cols, 2008).

Como se mencionó anteriormente las células piramidales presentan diferencias morfológicas de acuerdo a su localización ya sea en la región CA1 ó CA3. Así en CA3 presentan gran heterogeneidad en organización y longitud dendrítica, situación que no ocurre en la región CA1 donde los árboles dendríticos son bastante más homogéneos. En términos generales las neuronas piramidales de CA1 son de menor tamaño que las de la región CA3 (Amaral y Lavenex, 2007), la dendrita apical en las células de CA3 se ramifica más cerca del soma que en las células de la región CA1 (ver figura 1.7), y el árbol dendrítico de las neuronas en CA3 presenta una mayor diversidad en la morfología de las espinas dendríticas (Spruston y McBain, 2007).



**Figura 1.7 Esquema de neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo.** Fuente: Adaptado Nieuwenhuys y cols, 2008.

Tanto las neuronas piramidales de CA1 como de CA3 presentan valores de potencial de membrana en reposo entre los -60 y -70 mV (Spruston y McBain, 2007), determinados por la existencia de varios tipos de canales (Rivera, 2006). Los valores de resistencia de entrada de neuronas pertenecientes a la región CA3 del hipocampo son ligeramente mayores a los de la región CA1 (Spruston y Johnston, 1992).

Los patrones de disparo de las neuronas piramidales de CA1 y CA3 están determinados tanto por el estímulo recibido como por las propiedades intrínsecas de las mismas. Estímulos despolarizantes que acerquen el potencial de membrana alrededor de los -40 ó -50 mV generan potenciales de acción de amplitud cercana a los 100mV. Determinadas conductancias en las células piramidales de las regiones CA1 y CA3 permiten que éstas respondan a estímulos que sobrepasen el valor umbral produciendo potenciales de acción en forma unitaria, fásica ó tónica.

Las células piramidales del hipocampo también pueden presentar patrones de disparo en forma de ráfagas (*burst*). El disparo en ráfagas se caracteriza por comprender un periodo corto de tiempo (entre 30 y 50 milisegundos) con una elevada frecuencia de disparos seguido por un periodo de inactividad. El periodo de actividad se compone de varios potenciales de acción sobre una onda despolarizante, los cuales generalmente se acompañan de potenciales dependientes de calcio de menor magnitud en la parte posterior de la onda. Al igual que un potencial de acción único cada ráfaga se considera como un evento de “todo o nada” (Buckmaster y Amaral, 2001; Spruston y McBain, 2007). El patrón de disparo en ráfaga se ha relacionado con procesos de plasticidad sináptica y es más frecuente en neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo (Frank y cols, 2001).

En consecuencia de una gran cantidad de aportes sinápticos simultáneos (liberación de neurotransmisores) neuronas piramidales con baja capacidad intrínseca de generar disparos en ráfaga son capaces de presentarlos. A su vez el patrón de disparo de las neuronas piramidales puede presentar cambios al modificar factores como: la concentración extracelular de potasio, la concentración extracelular de calcio y la osmolaridad del medio (Azouz y cols, 1997; Su y cols, 2001).

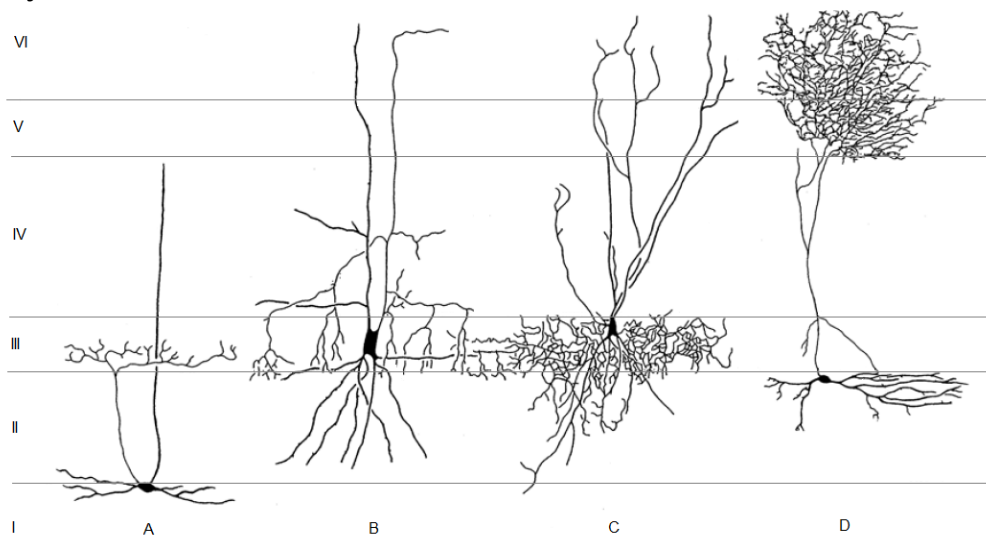
## 2.1 CIRCUITOS INTERNEURONALES A NIVEL DE HIPOCAMPO

Debido a la cantidad y al área somatodendrítica que representan las células piramidales a nivel del hipocampo son los principales constituyentes de los circuitos en esta la región. Sin embargo la presencia de más de 18 tipos distintos de interneuronas a nivel hipocampal enriquece el tipo de relaciones existentes entre ellas y forma un entramado bastante complejo (Parra y cols, 1998).

Los axones de las células piramidales descienden al alveo donde pueden bifurcarse y luego proyectarse a otras estructuras. Los segmentos iniciales de estos axones a su vez pueden establecer sinapsis excitatorias con otras células piramidales (Deuchars y Thomson, 1996) y con varios tipos de interneuronas.

La mayoría de interneuronas hipocampales son de tipo inhibitorias y forman sinapsis axonales, somáticas y dendríticas. Entre las principales interneuronas destacan: células piramidales de cesta, neuronas oriens-alveus (O/A), células axoaxónicas (A/A), células lacunosum-moleculare (L/M), y células oriens-lacunosum-moleculares (O/LM) (ver figura 1.8). Donde las interacciones características se producen entre células O/A y células L/M. Las células (L/M) también establecen sinapsis inhibitorias con células piramidales de cesta (ver figura 1.9).

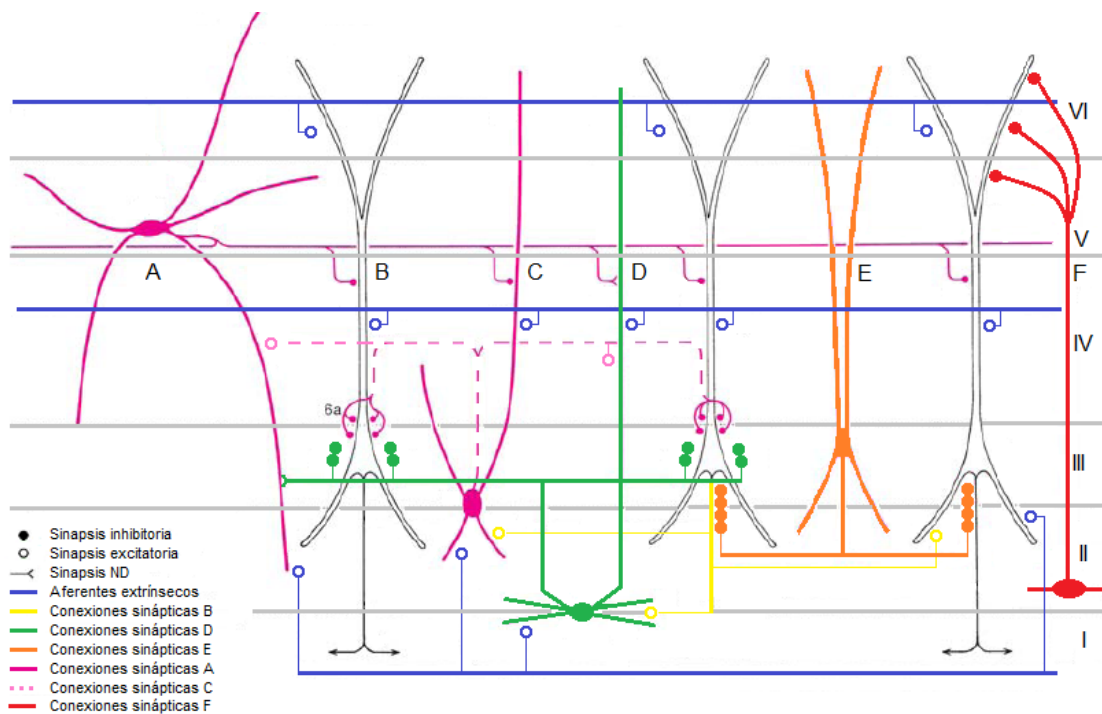
Las ramificaciones axonales de las células piramidales de cesta forman un plexo denso en forma de canasta alrededor de los soma y las dendritas proximales de células piramidales (ver figura 1.9). Y reciben señales excitatorias de células piramidales y de aferentes a nivel del alveus y del estrato radiatum.



**Figura 1.8 Principales tipos de interneuronas presentes en el hipocampo.** Conexiones entre las células piramidales del hipocampo (B) y los principales tipos de interneuronas. A: neuronas oriens-alveus (O/A), B: células piramidales de cesta, C: células axoaxónicas (A/A), D: células oriens-lacunosum-moleculares (L/M), I: alveus, II: stratum oriens, III: stratum pyramidale, IV: stratum radiatum, V: stratum lacunosum, VI: stratum moleculare. Fuente: Adaptado Nieuwenhuys y cols, 2008.

Las células O/A constituyen un tipo específico de células de cesta que establecen sinapsis inhibitorias con células piramidales, células piramidales de cesta, e interneuronas L/M. Las células O/A reciben señales excitatorias de células piramidales colaterales y de fibras aferentes en el estrato radiatum y el alveus (ver figura 1.9).

Las células que establecen conexiones axoaxónicas son interneuronas especializadas que presentan múltiples contactos inhibitorios con la porción inicial de los axones de las células piramidales. Las células L/M se hallan principalmente en la región CA1 del hipocampo, tienen somas fusiformes o multipolares, y procesos dendríticos con cuentas carentes de espinas que se ramifican en estrato lacunosum, molecular y radiatum (Nieuwenhuys y cols, 2008). Presentan sinapsis excitatorias con fibras aferentes en el alveus, estrato radiatum y estrato molecular. Mientras que las ramificaciones axonales de la células L/M establecen sinapsis inhibitorias con neuronas piramidales, células piramidales de cesta e interneuronas O/A (ver figura 1.9).

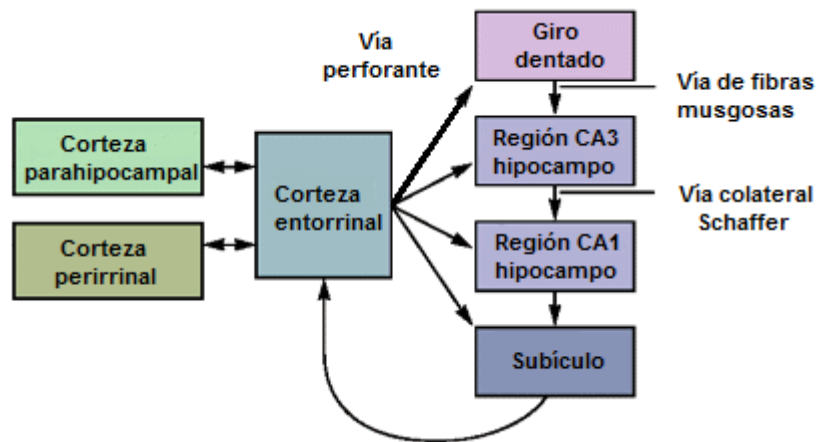


**Figura 1.9 Principales relaciones neuronales en la región CA1 del hipocampo.** Conexiones entre las células piramidales del hipocampo (B) y los principales tipos de interneuronas. A: células lacunosum-moleculare (L/M), C: células piramidales de cesta, D: neuronas oriens-alveus (O/A), E: células axoaxónicas (A/A), F: células oriens-lacunosum-moleculares (O/LM). I: alveus, II: stratum oriens, III: stratum pyramidale, IV: stratum radiatum, V: stratum lacunosum, VI: stratum moleculare. Fuente: Adaptado Nieuwenhuys y cols, 2008.

## 2.2 CONEXIONES INTRÍNSECAS DEL HIPOCAMPO

La mayoría de la información que accede al hipocampo lo hace a través de la corteza entorrinal por lo que se considera como el punto de inicio del circuito hipocampal. A nivel de la corteza entorrinal se da la convergencia de información sensorial proveniente de la corteza perirrinal y la corteza parahipocampal ó postririnal (Johnston y Amaral, 2004). De la corteza entorrinal específicamente de las células granulares o células esteladas de la corteza entorrinal se originan proyecciones que conducen al giro dentado mediante fibras conocidas como la vía perforante o temporo amónica (Witter y Amaral, 1991; Buckmaster y cols, 2004). Algunas proyecciones que no terminan en el giro dentado inervan regiones CA1 y CA3 del hipocampo y el subículo (ver figura 1.10).

Los axones de las células granulares del giro dentado conocidos como fibras musgosas o fibras *mossy* acceden al estrato radiatum de la región CA3 del hipocampo, donde establecen sinapsis con células piramidales. Los axones de las células piramidales de la región CA3 penetran hasta llegar al alveus, no sin antes producirse una serie de vínculos colaterales en estrato oriens (colaterales de Schaffer) (ver figura 1.10). Muchas de estas ligaduras a nivel del estrato oriens o del estrato piramidal acceden a la región CA1 y entran en contacto con axones y dendritas de células piramidales en CA1 (Johnston y Amaral, 2004). Las neuronas piramidales de CA1 se proyectan principalmente hacia el subículo y de éste hasta la corteza entorrinal (ver figura 1.10) cerrando así el circuito de proyecciones de naturaleza excitatoria y unidireccional (Kandel y cols, 2000) a diferencia de la mayoría de conexiones a nivel de la neocorteza donde es común la reciprocidad (Amaral y Lavenex, 2007).



**Figura 1.10 Representación esquemática de las vías intrínsecas de transmisión de información a nivel de hipocampo.** Dirección de la transmisión se establece por el sentido de las flechas. Fuente: Adaptado Kandel y cols, 2000.



## 2.3 AFERENCIAS Y EFERENCIAS DEL HIPOCAMPO

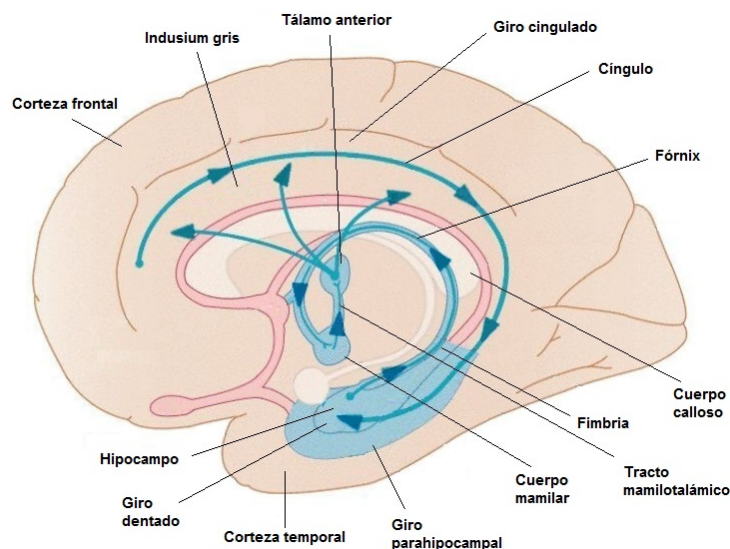
Estímulos externos capaces de activar y modular la transmisión nerviosa a nivel del hipocampo pueden provenir de varias fuentes. Las principales aferentes extrínsecas de las células piramidales están constituidas por fibras provenientes de la corteza entorrinal, núcleo septal medial, el hipocampo contralateral, complejo amigdalino, banda diagonal de Broca, tálamo, región supramamilar y grupos de células monoaminérgicas del tronco del encéfalo (Johnston y Amaral, 2004). Aferencias que generalmente crean sinapsis excitatorias con porciones específicas del árbol dendrítico de células piramidales.

Las fibras nerviosas que salen del hipocampo se clasifican principalmente en cuatro grupos: eferentes del hipocampo, contribuciones del complejo subicular al fórnix precomisural, contribuciones del complejo subicular al fórnix postcomisural y eferencias no relacionadas con el fórnix (Nieuwenhuys y cols, 2008). Las fibras eferentes del hipocampo finalizan en el núcleo septal lateral, mientras que las fibras precomisurales del fórnix se distribuyen al núcleo septal lateral, núcleo accumbens, núcleo caudado, putamen, núcleo olfatorio anterior, hipocampo precomisural, la sección media de la corteza frontal y el giro recto (Amaral y Lavenex, 2007). En el cuerpo mamilar terminan las fibras postcomisurales del fórnix originadas a nivel subicular. Mientras que las eferencias del hipocampo no relacionadas con el fórnix se extienden al complejo amigdalino (en una proporción mucho menor que en sentido inverso) y a la neocorteza.

## 2.4 CIRCUITO DE PAPEZ

De las contribuciones del complejo subicular al fórnix postcomisural sobresale el circuito de Papez, descrito por primera vez en 1937 por James Papez, neurólogo estadounidense. Este circuito está constituido por vías eferentes del hipocampo que viajan al fórnix y se conectan con neuronas del cuerpo mamilar, las cuales proyectan axones dentro del tracto mamilotalámico al tálamo anterior. A su vez, el tálamo anterior proyecta al giro cingulado, el cual como su nombre lo indica, gira alrededor del cuerpo calloso para conectar con el giro parahipocampal, formando un círculo que une la corteza cerebral y el hipotálamo (ver figura 1.11). Dando el sustrato anatómico donde convergen actividades cognitivas, emociones y expresiones. Posteriormente y

tras comprobar su aporte se amplía el circuito al incorporar otras estructuras cerebrales como la amígdala, la corteza prefrontal y el septum (Bear y cols, 2006; Eslinger, 2010).



**Figura 1.11 Representación de las vías de comunicación entre la formación hipocampal y el diencefalo.** El círculo cerrado corresponde a la descripción clásica del circuito de Papez en el cual intervienen el giro parahipocampal, el hipocampo, los cuerpos mamilares, el tálamo anterior y el giro cingulado. Se observa que la neocorteza (parte del telencéfalo) puede tener efecto en el circuito. Fuente: Adaptado Waxman, 2009.

## 2.5 ASPECTOS FUNCIONALES Y CLÍNICOS RELACIONADOS CON EL HIPOCAMPO

Se ha determinado que el lóbulo temporal medio que abarca la formación hipocampal (regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo, giro dentado y complejo subicular), la corteza perirrinal, entorrinal y parahipocampal posee un papel determinante en el proceso de aprendizaje y la memoria (Corkin y cols, 1997).

La existencia de gran cantidad de conexiones y la reciprocidad de las mismas, entre la formación hipocampal (hipocampo, subículo, corteza entorrinal) y el complejo septo medial; el cual recibe proyecciones del hipotálamo y de grupos de células monoaminérgicas del tronco del encéfalo (ver sección 2.2); sugieren que estos pueden modular el flujo de información a nivel del circuito hipocampal pudiendo afectar el comportamiento (Swanson, 2000). A su vez el núcleo lateral del septum que recibe aportes glutamatérgicos del hipocampo y del subículo por la vía

precomisural del fórnix se proyecta a zonas hipotálamicas específicas (Risold y Swanson, 1997) que regulan comportamientos relacionados con la supervivencia. Deficiencias colinérgicas a nivel del hipocampo provocan alteraciones en la memoria y el aprendizaje (Cobb y Davies, 2005), y se asocian a enfermedades neurológicas como EA, esquizofrenia y epilepsia (Dani y Bertrand, 2007). Una disfunción característica en los pacientes con EA es la incapacidad de formar nuevos recuerdos, sin embargo recuerdos antiguos no sufren afectación. Dicha alteración se ha relacionado con el daño en la formación hipocampal y en regiones corticales adyacentes (Van Hoesen y cols, 2000), donde se observa una pérdida importante de neuronas piramidales a nivel de CA1 y subículo. Estructuras importantes en la formación de conexiones en el circuito intrínseco del hipocampo (ver sección 2.2) y en la formación de las vías eferentes (ver sección 2.3). A su vez en la EA se observan cambios patológicos severos en la capa II de la corteza entorrinal y en la capa molecular del giro dentado estructuras que constituyen el inicio y el fin respectivamente de la vía perforante (ver figura 1.10).

### 3.0 NEUROTRANSMISIÓN COLINÉRGICA

Los neurotransmisores liberados en la hendidura sináptica transmiten la información al unirse a los receptores presinápticos y postsinápticos. La primera monoamina con funciones de neurotransmisión que se descubrió fue la acetilcolina (ACh) (Tansey, 2006). Algunas neuronas del sistema nervioso central y neuronas somáticas de las uniones neuromusculares utilizan la acetilcolina como neurotransmisor. En las terminaciones nerviosas autónomas la ACh puede actuar como excitador o inhibidor según el órgano implicado, mientras que a nivel cerebral constituye uno de los principales neurotransmisores excitadores (Ira, 2008; Velázquez-Flores y Salceda, 2011). El sistema colinérgico junto con el sistema glutamatérgico representan vías de neurotransmisión fundamentales en los estados emocionales, procesos de atención, aprendizaje, plasticidad neuronal y la función cognitiva (Schliebs y Arendt, 2010).

La síntesis de la ACh se produce en el citoplasma por medio de la acetil-CoA transferasa que se sintetiza en el soma y es transportada a la membrana de las vesículas sinápticas y a las cercanías de los terminales neuronales (Albuquerque y cols, 2009). La acetil-CoA transferasa es la encargada de incorporar el grupo acetil-CoA a la colina (ver figura 1.12).

La colina puede provenir de distintas fuentes siendo la principal la dieta. Otros orígenes pueden ser: la hidrólisis de fosfolípidos de membrana, síntesis *de novo* a nivel cerebral, síntesis hepática e hidrólisis de la ACh. La colina libre en el espacio intersináptico, producto de la hidrólisis de ACh, es recapturada por la célula presináptica mediante sistemas de transporte (Mikiciuk-Olasik y cols, 2007). Mientras la acetil-CoA se sintetiza a nivel mitocondrial.

La ACh se almacena en los terminales presinápticos de tres formas principales: libre en el citoplasma, asociada a membranas y dentro de vesículas sinápticas siendo esta última la forma más abundante (Ira, 2008).

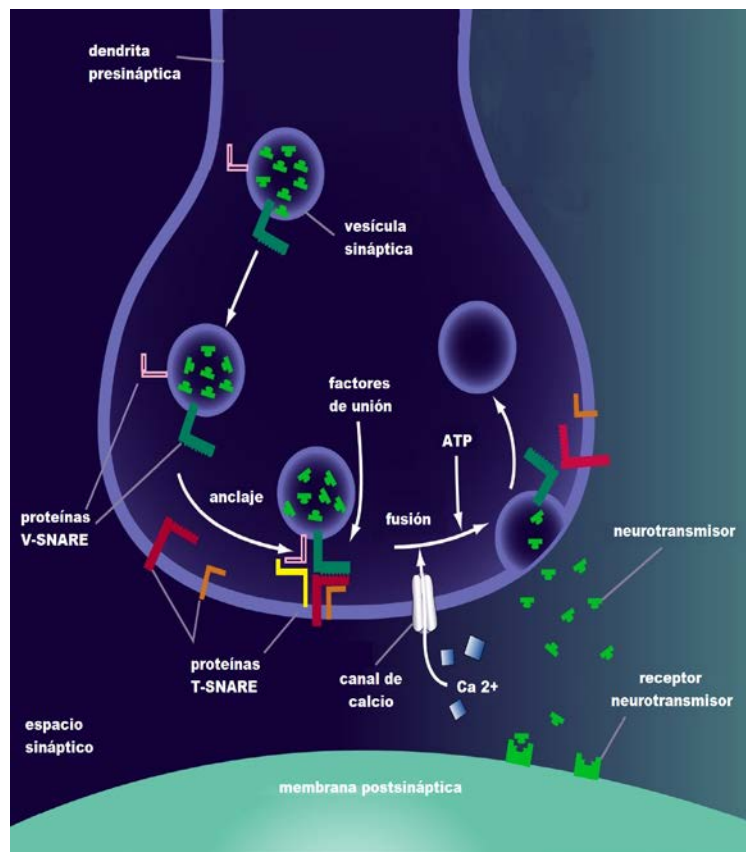
La apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  presinápticos consecuencia de la despolarización favorece la entrada del ion al terminal, una vez dentro se une a la sinaptotagmina (proteína de la membrana de las vesículas que contienen el neurotransmisor) origina un cambio de conformación y la exocitosis del neurotransmisor por medio de un proceso muy organizado y regulado en el que participan varias proteínas y estructuras del citoesqueleto (Moulder y cols, 2003) (ver figura 1.13).



**Figura 1.12 Síntesis, almacenamiento y secreción de la acetilcolina.** Fuente: Adaptado del banco de imágenes del Lundbeck Institute, 2010. Reproducida bajo permiso Lundbeck Institute.

La unión de la ACh con el receptor dura unos breves instantes ya que este complejo monoamina – receptor se disocia rápidamente, sin embargo si la ACh persiste en medio el complejo se puede volver a formar. En las sinapsis colinérgicas la acetilcolinesterasa se encuentra a nivel presináptico y postsináptico. Mientras que en células gliales cercanas a la sinapsis se encuentra la butirilcolinesterasa. Ambas enzimas son capaces de degradar hidrolíticamente la acetilcolina evitando así una posible desensibilización del receptor por la presencia mantenida (Marco, 2002; Mesulam, 2004; Ira, 2008) (ver figura 1.14).

La neurotransmisión colinérgica es mediada tanto por receptores ionotrópicos (LGICs *ligand-gated ion channels*) ó nicotínicos como por receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) ó muscarínicos llamados metabotrópicos. La clasificación de los receptores ionotrópicos de acetilcolina como nicóticos y los acoplados a proteínas G como muscarínicos se basa en las sustancias capaces de agonizar o antagonizar respuestas colinérgicas en estos receptores.

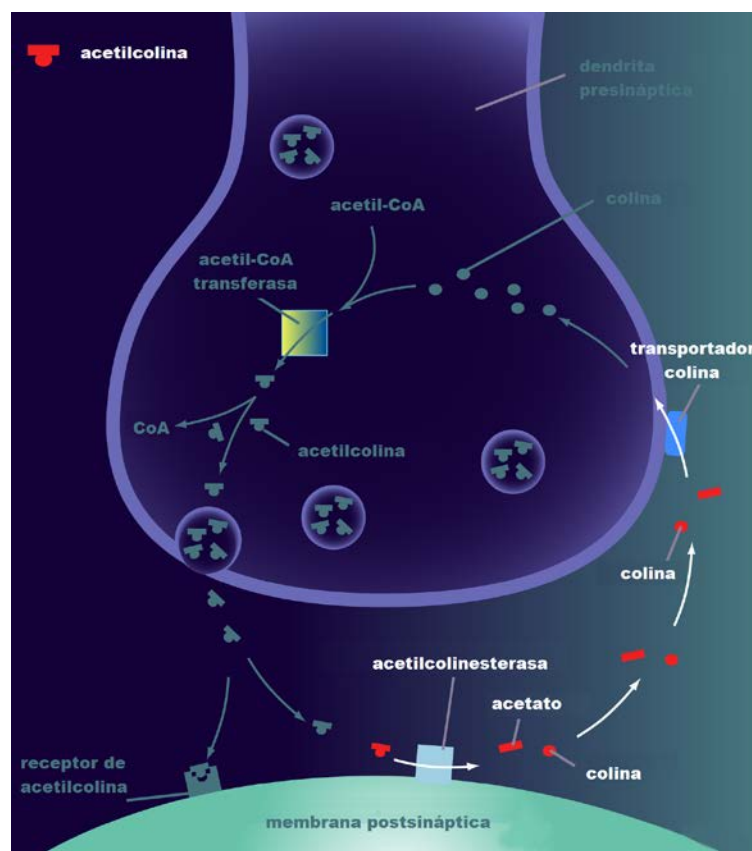


**Figura 1.13 Liberación por exocitosis de acetilcolina.** La entrada del ión calcio ( $Ca^{2+}$ ) favorece la liberación del neurotransmisor a través de un proceso complejo y controlado. En términos generales proteínas de la membrana de la vesícula llamadas v-SNARE (sinaptotagmina, sinaptobrevina) interactúan con proteínas de la membrana de la terminación nerviosa llamadas t-SNARE (syntaxina, SNAP-25) con el fin de que se produzca el anclaje de la vesícula a la membrana, para estabilizar el complejo recién formado intervienen factores de unión (NSF, SNAP). Posteriormente, tiene lugar la fusión de la membrana de la vesícula con la membrana de la terminación nerviosa y la liberación del neurotransmisor. Fuente: Adaptado del banco de imágenes del Lundbeck Institute, 2010. Reproducida bajo permiso Lundbeck Institute.

### 3.1 RECEPTORES NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA (nAChRs)

Los LGICs *per se* constituyen un canal iónico donde su activación permite un flujo selectivo de iones al interior celular el cual modifica el potencial de reposo de la neurona. El grado de despolarización o hiperpolarización de la membrana celular determina la generación o no de la señal propagada y por tanto de la transmisión de la información. Las respuestas observadas por la activación de estos receptores son rápidas.

Los LGICs pertenecen a la superfamilia de canales iónicos que incluye: receptores de glutamato (NMDA, kainato, AMPA), receptores purinérgicos de ATP (P2X), miembros de la subfamilia de receptores de tipo *cys-loop* (CL) que comprende receptores nicotínicos de acetilcolina, de ácido  $\gamma$ -aminobutírico, de glicina, de serotonina y de zinc (Velázquez-Flores y Salceda, 2011). Estructuralmente los receptores tipo *cys-loop* presentan dos cisteínas altamente conservadas en el dominio amino terminal importantes para la unión del ligando y todos sus miembros están constituidos por cinco subunidades dispuestas de forma asimétrica formando poro por donde se da el flujo iónico (Lester y cols, 2004).

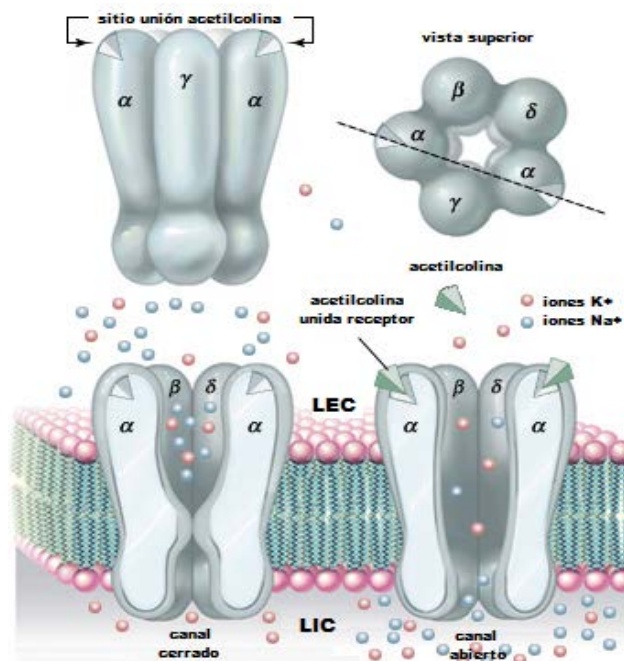


**Figura 1.14 Degradación hidrolítica de la acetilcolina.** CoA: coenzima A. Fuente: Adaptado del banco de imágenes del Lundbeck Institute, 2010. Reproducida bajo permiso Lundbeck Institute.

Cada subunidad posee cuatro segmentos transmembrana (TM1, TM2, TM3, TM4) en forma de  $\alpha$ -hélice, un dominio amino y otro carboxilo terminal localizados en la región extracelular (ver figura 1.16), así como un dominio citoplasmático con sitios de fosforilación. Los aminoácidos que constituyen la  $\alpha$  hélice del segmento TM2 presentan propiedades anfipáticas y conforman el poro del receptor (ver figura 1.16) (Waxham, 2004).

Las distintas combinaciones de las subunidades favorecen un número elevado de receptores nicotínicos de acetilcolina con propiedades farmacológicas y localizaciones muy variadas (Taly y cols, 2009). Los receptores nicotínicos pueden localizarse en neuronas, unión neuromuscular o en los ganglios autónomos. Y según la naturaleza de los receptores nicotínicos muestran variaciones aún cuando sean codificados por genes homólogos (Millar y Gotti, 2009; Yakel, 2010). Avances en biología molecular, genética, técnicas de microscopía electrónica y cristalografía de rayos X han permitido corroborar esta variedad.

Como se mencionó anteriormente, los receptores nicotínicos son pentámeros compuestos por distintas subunidades. En los vertebrados existen diecisiete subunidades homólogas que componen los receptores nicotínicos ( $\alpha 1$ - $\alpha 10$ ,  $\beta 1$ - $\beta 4$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ), siendo la configuración más frecuente la compuesta por dos subunidades  $\alpha$  idénticas, una  $\beta$ , una  $\gamma$  y una  $\delta$ ; relacionadas en secuencia y estructura terciaria formando un poro central (ver figura 1.15) (Gotti y cols, 2006; Nashmi y Lester, 2006).



**Figura 1.15 Estructura de los receptores nicotínicos de acetilcolina.**  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ : subunidades que componen receptor nicotínico transmembrana de acetilcolina, LEC: líquido extracelular, LIC: líquido intracelular, K<sup>+</sup>: iones potasio, Na<sup>+</sup>: iones sodio. Fuente: Adaptado de Waxman, 2009.

La distribución cerebral de los receptores nicotínicos es relativamente homogénea y no se restringe a determinadas vías colinérgicas, sin embargo es más densa en algunas regiones como el tálamo, la corteza y los ganglios basales. Su ubicación puede ser presináptica, postsináptica o perisináptica. Y en comparación con los receptores muscarínicos de acetilcolina presenta una densidad cerebral menor.

Los receptores nicotínicos presinápticos funcionan como autoreceptores: modulando la liberación de neurotransmisores entre ellos la ACh. Mientras que los receptores postsinápticos median procesos de transmisión sináptica excitatoria (Waxham, 2004, Albuquerque y cols, 2009). Específicamente los  $\alpha 4\beta 2$  modulan la liberación de dopamina, noradrenalina, glutamato y GABA (Wonnacott y cols, 2006). Lo que señala la gran importancia de los mismos no sólo en la regulación de las vías colinérgicas, sino en otros sistemas de neurotransmisión.

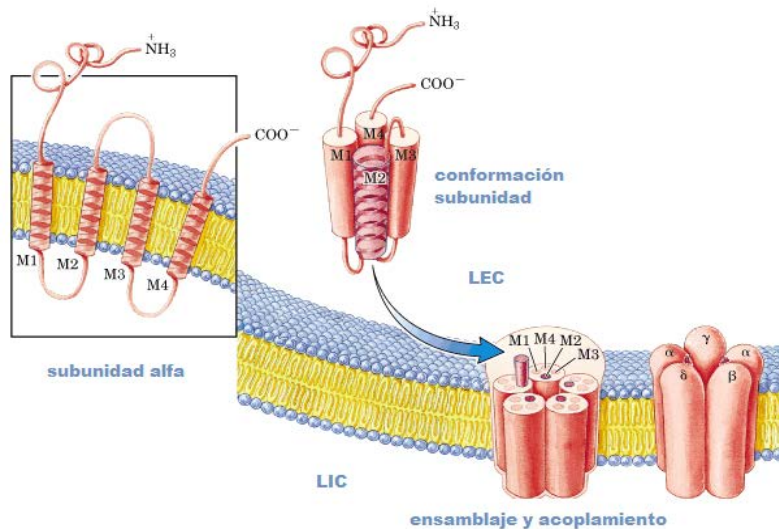
A nivel neuronal los pentámeros de los receptores nicotínicos están constituidos únicamente por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . El ensamblaje de dichos receptores se realiza a partir de doce posibles subunidades nueve  $\alpha$  y tres  $\beta$  (Gandía y cols, 2002). Donde combinaciones entre las subunidades  $\alpha 2$ - $\alpha 6$ ,  $\alpha 10$ ,  $\beta 2$ - $\beta 4$  generan los principales heteropentámeros, mientras que homopentámeros están constituidos principalmente por subunidades  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$ . De las subunidades  $\alpha$ , la  $\alpha 4$  es la que presenta una mayor expresión cerebral, entretanto la subunidad  $\beta$  se coexpresa con todas la subunidades  $\alpha$ . Siendo los receptores  $\alpha 4\beta 2$  y  $(\alpha 7)_5$  los más abundantes a nivel neuronal (Zouridakis y cols, 2009; Schliebs y Arendt, 2010).

El ensamblaje específico de las subunidades de los nAChRs es importante en la determinación de la afinidad por un ligando así los  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$  presentan una elevada afinidad por nicotina mientras que dicha afinidad es baja en los  $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ . A su vez el bucle citoplasmático de cada subunidad presenta una secuencia única de aminoácidos donde las fosforilaciones juegan un papel determinante en la expresión, tráfico, desensibilización y funcionalidad de los nAChRs (Wang y cols, 2004; Kuo y cols, 2005; Ren y cols, 2005; Castelan y cols, 2007).

En los nAChRs neuronales específicamente en los homopentámeros el sitio de unión del ligando se localiza en la zona ubicada entre dos subunidades  $\alpha$ , mientras que en los heteropentámeros éste se localiza entre una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ . Cabe destacar que las subunidades  $\alpha 5$  y  $\beta 3$  no participan en la conformación del sitio de unión del ligando (Zouridakis y cols, 2009). La existencia de sitios alostéricos ajenos al sitio ortostérico en los nAChRs es frecuente, éstos modulan la actividad del canal ya sea incrementándola o disminuyéndola. Los



sitios de regulación alostérica se pueden hallar tanto dentro del poro, a nivel extracelular, en la membrana o en el citoplasma (Hogg y cols, 2005).



**Figura 1.16 Conformación y acoplamiento de los segmentos transmembrana y las subunidades del receptor nicotínico de acetilcolina.** M1, M2, M3, M4: segmentos transmembrana de la subunidad en cuestión,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ : subunidades que componen receptor nicotínico de acetilcolina,  $\text{NH}_3^+$ : extremo amino terminal,  $\text{COO}^-$ : extremo carboxilo terminal, LEC: líquido extracelular, LIC: líquido intracelular. Fuente: Adaptado de Ira, 2008.

Ya que los receptores nicotínicos forman canales permeables a los cationes la unión de la acetilcolina a estos receptores origina un flujo de iones positivos  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ . Donde principalmente se produce entrada de iones sodio y una salida de iones potasio  $((\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ ,  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ ) aunque también se ha descrito la entrada a la célula de iones calcio  $((\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ ,  $((\alpha 7)_5)$ .

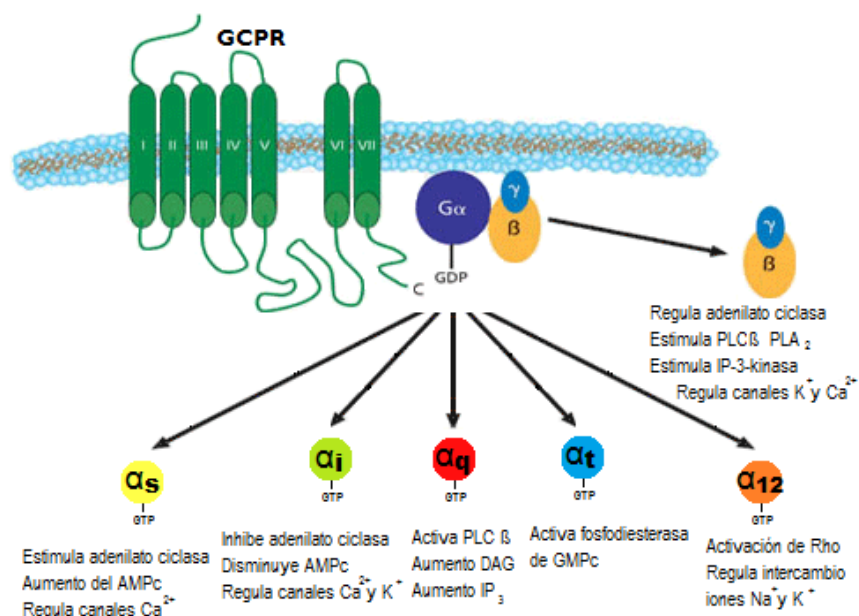
### 3.2 RECEPTORES MUSCARÍNICOS DE ACETILCOLINA (mAChRs)

Los receptores muscarínicos de acetilcolina se encuentran asociados a una proteína con acción enzimática (GTPasa) (Smith, 2003) y se les conoce como receptores acoplados a nucleótidos de guanina o receptores acoplados a proteína G (Christopoulos, 2007). La cantidad de GPCRs es muy abundante habiéndose descrito más de 1000 tipos distintos. Los receptores  $\beta$  – adrenérgicos ( $\beta$ ARs) y los mAChRs forman parte de este tipo de receptores y son los que se encuentran mejor caracterizados estructuralmente (Waxman, 2009).

Generalmente las proteínas G con actividad catalítica son trómeros heterogéneos constituidos por subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ . Sin embargo existen proteínas G monoméricas que se activan por medio GPCRs como la proteína Rho que interviene en la regulación del crecimiento y organización del citoesqueleto (Ishii y Kurachi, 2006).

Las proteínas G triméricas se asocian al receptor transmembrana específicamente en la cara interna de la membrana plasmática mediante cadenas de ácidos grasos presentes en las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$ . De las tres subunidades,  $\alpha$  es la de mayor tamaño y la que presenta actividad enzimática; por lo que durante mucho tiempo se subestimó la importancia de las otras subunidades. Actualmente se relaciona el dímero  $\beta - \gamma$ , inseparable en condiciones fisiológicas, con la regulación de la vía de señalización. Ya que ejerce una influencia directa en la efectividad de activación de los GPCRs y modula gran cantidad de canales y enzimas (Schulman, 2004).

La superfamilia GTPasa es muy diversa se han descrito más de 27 isoformas de la subunidad  $\alpha$  divididas en cinco clases principales ( $\alpha_s$ ,  $\alpha_i$ ,  $\alpha_t$ ,  $\alpha_q$ ,  $\alpha_{12}$ ) que ejercen su efecto a través de distintas vías de señalización (ver figura 1.17). De la subunidad  $\beta$  se han descrito 5 isoformas mientras que de la  $\gamma$  14, dando una gran cantidad de combinaciones posibles de heterotrómeros (Neer, 1995; Smith, 2003).



**Figura 1.17 Principales clases y funciones de los monómeros  $\alpha$  de las proteínas G.** GPCR: Receptor acoplado a proteína G con siete segmentos transmembrana (I, II, III, IV, V, VI, VII). Se observa la proteína G inactiva en forma de trímero (subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) asociado a GDP (guanosin difosfato), y la forma activa al asociarse a GTP (guanosin trifosfato) y disociarse el trímero. AMPc: adenosin monofosfato cíclico,  $Ca^{2+}$ : iones calcio,  $K^+$ : ión potasio,  $Na^+$ : iones sodio, PLC  $\beta$ : fosfolipasa C tipo  $\beta$ , DAG: diacilglicerol,  $IP_3$ : inositol trifosfato, GMPc: guanosin monofosfato cíclico, Rho: proteína Rho. Fuente: Adaptado de Sigma Aldrich® Learning Center.

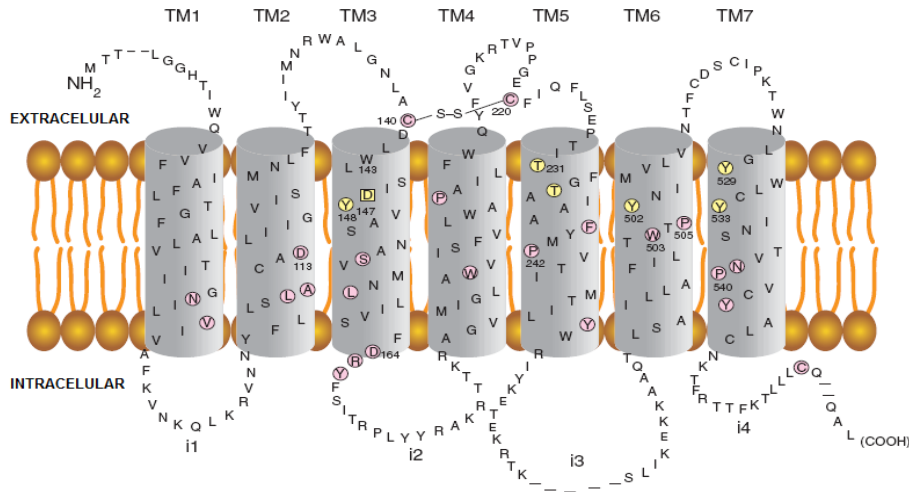
En el estado inactivo la proteína G se encuentra como trímero y la subunidad  $\alpha$  se encuentra unida a una molécula de GDP. La activación del receptor genera la disociación del trímero y favorece un cambio conformacional que lleva a la liberación de la molécula de GDP, liberación que es regulada por el factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEF). En el lugar que deja libre el GDP se adhiere una molécula de GTP, acople favorecido por una mayor concentración intracelular de GTP. Con la adherencia del GTP la subunidad  $\alpha$  se activa y facilita procesos determinados, muchos de los cuales requieren energía la cual se obtiene de la hidrólisis del GTP unido a la subunidad  $\alpha$ . Esta hidrólisis lleva nuevamente a la subunidad  $\alpha$  al estado inactivo. El proceso se lleva a cabo debido a la actividad GTPasa intrínseca de las proteínas G y a la regulación por parte de la proteína aceleradora de la actividad GTPasa (GAP) (Smith, 2003).

Generalmente la activación de los GPCRs produce cambios en la concentración de metabolitos a nivel intracelular, sin embargo hay casos en que dicha activación no se acompaña de cambios importantes en los metabolitos intracelulares y su efecto ocurre únicamente por la interacción con la proteína G (Waxham, 2004). Los efectos producto de la activación de los GPCRs, son más lentos que los observados al activar un receptor ionotrópico, no obstante generan efectos más duraderos debido a la vida media asociada al metabolito intermediario que produce (Waxman, 2009).

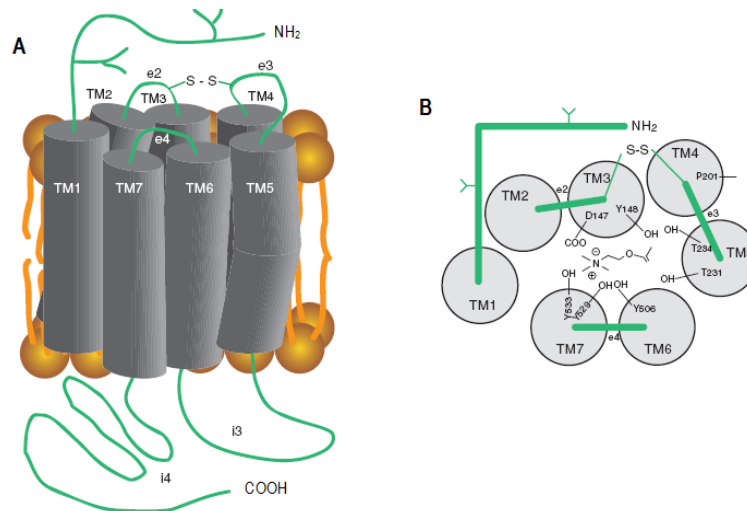
Los GPCRs forman parte integral de la membrana plasmática, estructuralmente son glicoproteínas con siete segmentos helicoidales constituidos por aproximadamente 24 aminoácidos, que atraviesan la membrana (TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6, TM7) (ver figura 1.18). Los segmentos transmembrana se organizan formando una estructura similar a un anillo dejando aminoácidos hidrofílicos en la parte interna del anillo. El extremo N-terminal de la proteína se ubica en la cara extracelular mientras que el extremo C-terminal en la intracelular (ver figura 1.18 y 1.19). Distintos subtipos de mAChRs presentan al menos un 90% de homología en la secuencia de aminoácidos que constituyen los segmentos transmembrana (Bonner, 1989; Hulme y cols, 1990; Christopoulos, 2007).

La unión entre segmentos transmembrana se da por medio de sucesiones de aminoácidos de la estructura primaria conocidos como bucles. Los bucles son de gran importancia para identificación y anclaje de proteínas al receptor; y se denominan como: i1, i2, i3, i4, e1, e2, e3, e4 de acuerdo a su posición y ubicación con respecto al extremo amino terminal (ver figuras 1.18 y 1.19) (Waxham, 2004). Los bucles citoplasmáticos i1, i2, i3 y el extremo

carboxilo terminal facilitan el reconocimiento y acople con la proteína G, ya que este requiere la presencia de porciones hidrofóbicas. El segmento i3 que se relaciona con una proteína G



**Figura 1.18 Representación de la secuencia y estructura del receptor muscarínico M3 de rata.** Presencia de los segmentos transmembrana (TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6, TM7) bucles extracelulares e intracelulares (i1, i2, i3). El bucle i3 puede tener secuencias de aminoácidos de longitud variable según el GCPR en cuestión, sección que se representa como una serie de líneas discontinuas. Los aminoácidos de color rosa son aquellos que se conservan de forma importante en los GCPRs, mientras que los representados con amarillo son los que se asocian con la ACh. Fuente: Schulman, 2004.



**Figura 1.19 Representación esquemática del receptor muscarínico de acetilcolina.** A. Vista lateral. mAChR con los segmentos transmembrana (TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6, TM7), bucles extracelulares e intracelulares (e2, e3, e4, i1, i2, i3), puente de disulfuro (S-S), extremo amino terminal (NH<sub>2</sub>) y extremo carboxilo terminal (COOH). B. Vista superior. Modelo del mAChR donde se identifican: los segmentos transmembrana (TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6, TM7), bucles extracelulares (e2, e3, e4), puente de disulfuro (S-S), extremo amino terminal (NH<sub>2</sub>), residuos importantes para la unión del ligando y residuos que favorecen estabilización. Fuente: Schulman, 2004.

específica (Smith, 2003), es muy variable y puede estar constituido por entre 29 y 242 aminoácidos según al GPCR que pertenezca. Sin embargo, el mayor determinante de la especificidad del acople de la proteína G en los mAChRs, está dado por la secuencia de aminoácidos en el extremo carboxilo terminal de la subunidad  $\alpha$  de la proteína G. También se ha descrito la existencia de interacciones entre el bucle i3 de los subtipos M2 y M3 de mAChRs y las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  de la proteína G.

El sitio ortostérico en los GPCRs se encuentra cerca de la zona medial de los segmentos transmembrana, donde hay aminoácidos con carga y polaridad específica. En los distintos tipos de GPCRs la presencia de residuos aminoacídicos altamente conservados tanto a nivel ortostérico como alostérico es frecuente. (Iarriccio-Silva, 2008; Conn y cols, 2009; Davis y cols, 2009). Sin embargo sitios de regulación alostérica poseen mayor variación entre los distintos subtipos de receptores (Wess y cols, 2007; Thomas y cols, 2008; Avlani y cols, 2010).

En el caso de GPCRs cuyos agonistas son animas biógenas la presencia de residuos de aspartato (D) en el segmento TM3 es una constante (ver figura 1.19) (Christopoulos, 2007). En los mAChRs también es frecuente la existencia de zonas ajenas tanto a los sitios ortostéricos como alostéricos altamente conservadas como la presencia de residuos de prolina (P) en el segmento TM4 (Waxham, 2004).

La mayor divergencia en la secuencia de los aminoácidos que componen los GPCRs, se da a nivel del extremo extracelular amino terminal, el bucle i3, y el extremo intracelular carboxilo terminal (Smith, 2003).

Los receptores muscarínicos de acetilcolina pertenecen a los GPCRs, se localizan principalmente en la membrana plasmática de células de músculo liso, músculo cardíaco, a nivel cerebral y de ciertas glándulas. Estos receptores se activan por muscarina y son antagonizados por atropina (Nelson y Cox, 2004; Ira, 2008).

Se han descrito cinco subtipos distintos de receptores muscarínicos (M1 – M5) que median la mayoría de las acciones de la acetilcolina tanto a nivel central como periférico (Spalding y Burstein, 2006; Jones y cols, 2008). Esta clasificación toma en cuenta: la respuesta a diferentes ligandos, tipo de proteína G con que se acopla el receptor y la naturaleza de los segundos mensajeros generados (ver figura 1.17). Los subtipos M1, M3 y M5 de los mAChRs se acoplan principalmente a proteínas G del tipo  $G_{q/11}$ , mientras que los subtipos M2 y M4 se acoplan principalmente a las tipo  $G_{i/o}$  (Conn y cols, 2009).

La clasificación en subtipos de los mAChRs se fundamenta en la utilización de antagonistas selectivos (ver tabla 1.3) debido a la existencia de una mayor correlación entre el antagonista y el subtipo de mAChR, que con respecto a los agonistas. El uso de agonistas selectivos presenta dificultades debido a la escasa selectividad de los mismos, la homogeneidad entre sitios ortostéticos y a que la unión de un ligando al mAChR puede modificar la asociación de éste con la proteína G y variar la afinidad por el ligando en este estado (Wess y cols, 2007). Sin embargo el uso de antagonistas tampoco evidencia inequívocamente efectos exclusivos por alguno de los subtipos de mAChRs (Enz, 2008; Heinrich y cols, 2009).

Los receptores mAChRs subtipo M1, se definen como aquellos que muestran una elevada afinidad porpirenzepina y 4-DAMP (4-difenilacetoxi-N-metilpiperidina) y afinidad media por el pFHHSiD (*para*-flouro-hexahidro-sila-difenidol). Los M2 presentan una elevada afinidad por tripitramina, metoctramina e himbacina y baja con:pirenzepina, 4-DAMP y pFHHSiD; mientras que los del subtipo M3 poseen una afinidad elevada por: 4-DAMP, pFHHSiD, darifencacina, y reducida para:pirenzepina, tripitramina, metoctramina e himbacina. Los mAChRs del subtipo 4, se definen como aquellos que tienen una alta afinidad por PD102807 y por la toxina muscarínica MT-3 (Potter, 2001).

La diferenciación farmacológica de los receptores muscarínicos subtipo M5 establece una de las mayores dificultades de este acercamiento sobretodo su diferenciación del subtipo M3 y se basa fundamentalmente en la menor afinidad por AQ RA 741 que muestra el subtipo M5 (ver tabla 1.3) (Christopoulos, 2007).

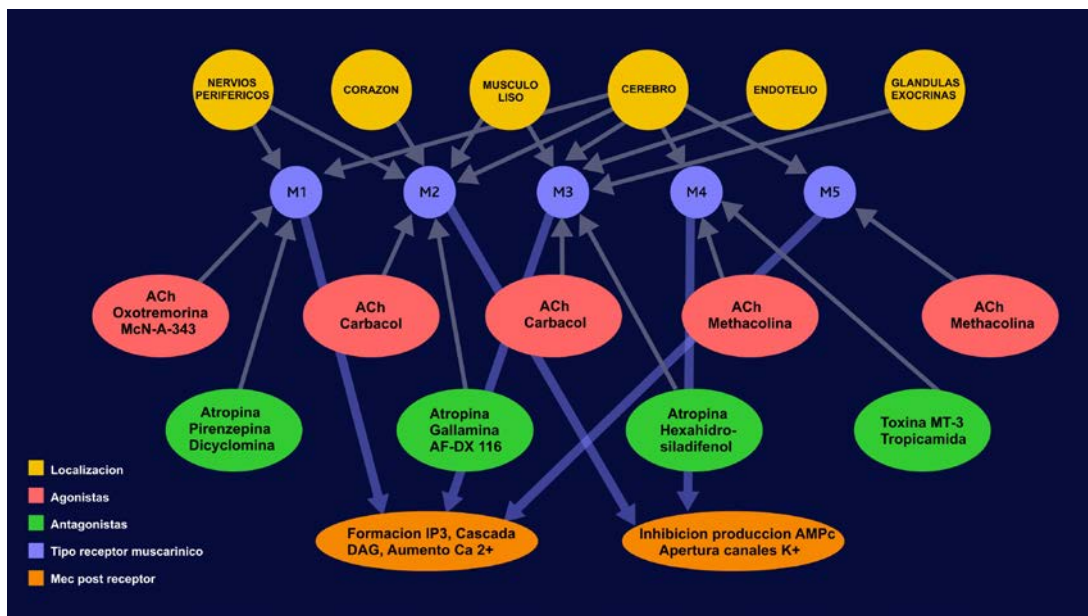
En términos generales los receptores muscarínicos de acetilcolina subtipo M1 son particularmente abundantes a nivel de la corteza e hipocampo (Mesulam, 2004; Caccamo y cols, 2006), los M2 se presentan principalmente en tejidos periféricos, los M3 en células secretoras y de músculo liso, los M4 a nivel cerebral específicamente en el estriado y los M5 en estructuras cerebrales y del sistema nervioso periférico (ver figura 1.20). Sin embargo, en el sistema nervioso se expresan los cinco subtipos de receptores muscarínicos de acetilcolina, variando considerablemente su distribución y densidad en las distintas regiones (Christopoulos, 2007; Jones y cols, 2008).

Los mAChRs subtipo M1 presentan una mayor densidad a nivel de hipocampo, corteza, núcleo accumbens, núcleo caudado y putamen. Aunque también se presentan en el giro dentado, el tubérculo olfatorio y la sección próximo-basal del cerebro. Regiones donde se

observa una importante formación de placas seniles y los ovillos neurofibrilares en la EA (Potter, 2010; Thathiah y De Strooper, 2011).

**Tabla 1.3 Valores de la constante de disociación ( $pK_B$ ) para antagonistas de los receptores muscarínicos de acetilcolina en mamíferos según subtipo.** Fuentes: Adaptado de Caulfield y Birdsall, 1998; Eglen, 1998; Eglen y cols, 2001.

ANTAGONISTA	SUBTIPO DE RECEPTOR MUSCARÍNICO				
	M1	M2	M3	M4	M5
Atropina	9,0 - 9,7	8,8 - 9,3	8,9 - 9,8	8,9 - 9,6	8,9 - 9,7
Pirenzepina	7,8 - 8,5	6,3 - 6,7	6,7 - 7,1	7,1 - 8,1	6,2 - 7,2
Metocramina	7,1 - 7,8	7,8 - 8,7	6,3 - 7,0	7,4 - 8,1	6,9 - 7,2
4-DAMP	8,6 - 9,4	7,8 - 8,4	8,9 - 9,3	8,4 - 9,4	8,3 - 9,0
Himbacina	6,8 - 7,2	7,7 - 8,3	6,9 - 7,4	7,5 - 8,8	6,1 - 6,3
AF-DX 384	7,3 - 7,5	8,2 - 9,0	7,2 - 7,8	8,0 - 8,7	6,3
Triptiramina	8,4 - 8,9	9,4 - 9,9	7,1 - 7,8	7,8 - 8,5	7,3 - 7,5
Darifenacina	7,5 - 7,8	7,0 - 7,4	8,4 - 8,9	7,7 - 8,0	8,0 - 8,1
PD 102807	5,3	5,7 - 5,8	6,2 - 6,3	7,3	5,2
AQ RA 741	7,6	8,9	7,5	8,0	6,0
pFHHSiD	7,4 - 7,7	6,7 - 6,9	7,7 - 7,8	7,2 - 7,5	6,9
MT3	7,1	<6	<6	8,7 - 9,0	<6
MT7	6,7 - 7,1	<6	<6	<6	<6



**Figura 1.20 Principales agonistas, antagonistas, localización y vía de señalización de los receptores muscarínicos según subtipo.** ACh: acetilcolina, MCN-A-343: cloruro de 4-[[[(3-clorofenil) amino] carbonil] oxil] -N,N,N- trimetil-2-butin-1-amonio , AF-DX 116: [11-[(2-[(diethylamino)metil]-1-piperidinil]acetil)-5, 11-dihidro-6H-pirido[2,3-b] [1,4] benzodiazol pine-6-ona MT-3: toxina muscarínica constituida por péptido aislado del veneno de la serpiente mamba verde, IP3: inositol trifosfato, DAG: diacilglicerol, AMPc: adenosin monofosfato cíclico, Ca<sup>2+</sup>: ión calcio, K<sup>+</sup>: ión potasio. Fuente: Adaptado del banco de imágenes del Lundbeck Institute, 2010. Reproducida bajo permiso Lundbeck Institute.

Con respecto a los mAChRs del subtipo M2 se presentan en la región occipital de la corteza cerebral, la región dorsal del núcleo caudado, el tubérculo olfatorio, el núcleo accumbens, las capas superficiales superiores e inferiores del colículo, la región pontina del IV ventrículo, el núcleo parabraquial, la región del trigémino, el tallo cerebral y el cerebelo (Wess y cols, 2007). Este subtipo se relaciona con funciones importantes en el aprendizaje, memoria, procesos de plasticidad y percepción del dolor. Debido a su distribución y localización sináptica presenta actividad como autoreceptor negativo a nivel de corteza e hipocampo (Volpicelli y Levey, 2004; Gautam y cols, 2006; Wess y cols, 2007).

El subtipo M3 presenta a nivel cerebral una densidad mucho menor que los subtipos M1 y M2, y se localizan principalmente en la lámina cortical y en las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo (Flynn y cols, 1997). Recientemente se ha relacionado los receptores muscarínicos subtipo M3 a nivel central con aspectos que involucran la memoria, aprendizaje condicionado (Poulin y cols, 2010), funciones oculares (Pomper y cols, 2011) e ingesta (Wess y cols, 2007).

Por su parte los mAChRs del subtipo M4 se localizan en el núcleo caudado, putamen, núcleo accumbens, regiones posteriores de la corteza, región CA1 del hipocampo, tubérculo olfatorio, región pontina del IV ventrículo, región del trigémino y el tallo cerebral. La expresión cerebral del subtipo M5 de mAChRs es considerablemente menor a la del subtipo M1 y se expresan fundamentalmente en la parte más externa de la corteza, el núcleo accumbens, el núcleo caudado, putamen, regiones CA1 y CA2 del hipocampo, la capa polimórfica del giro dentado, el tubérculo olfatorio, la región superior del colículo y las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo (Wess, 2004; Eglen, 2006). Los receptores subtipo M5 se asocian con: aprendizaje, memoria, regulación colinérgica y dopaminérgica central, efecto adictivo, control del movimiento y dilatación de vasos pequeños a nivel cerebral (Tzavara y cols, 2004; Araya y cols, 2006; Wess y cols, 2007; Jeon y cols, 2010).

Los subtipos M1 y M4 presentan mayor abundancia en corteza e hipocampo (ver figura 1.21) y están involucrados en funciones relacionadas con: aprendizaje, memoria, comportamiento, control del movimiento, plasticidad neuronal del prosencéfalo y regulación de la dopamina a nivel central (Hasselmo, 2006; Origlia y cols, 2006; Dalley y Everitt, 2009; Thathiah y De Strooper, 2011). Lo cual explica su rol en trastornos cognitivos, síntomas esquizofrénicos y trastornos asociados al movimiento. Los mAChRs subtipo M4 también relacionan con la percepción de dolor (Wess y cols, 2007)



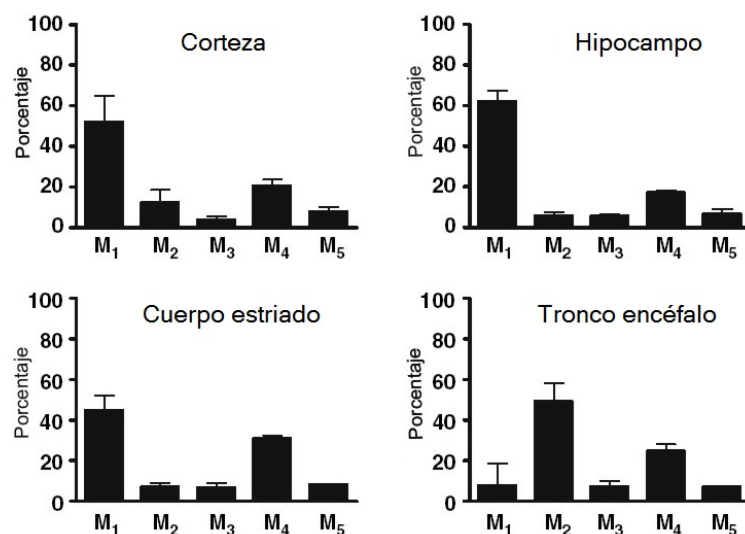


Figura 1.21 Cantidad de receptores muscarínicos de acetilcolina por región cerebral según subtipo. M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub>, M<sub>5</sub>: subtipos 1, 2, 3, 4, y 5 del mAChR. Fuente: Adaptado de Flynn y cols, 1997.

Al igual que otros GPCRs, los mAChRs además del sitio de unión del ligando poseen por lo menos dos sitios alostéricos de localización más externa. Estas áreas presentan una mayor divergencia entre los distintos subtipos que los sitios ortostéticos y funcionan modulando la unión del neurotransmisor al receptor ya que generalmente carecen de efecto en ausencia del ligando ortostérico (May y cols, 2007; Wess y cols, 2007; Iarriccio-Silva, 2008).

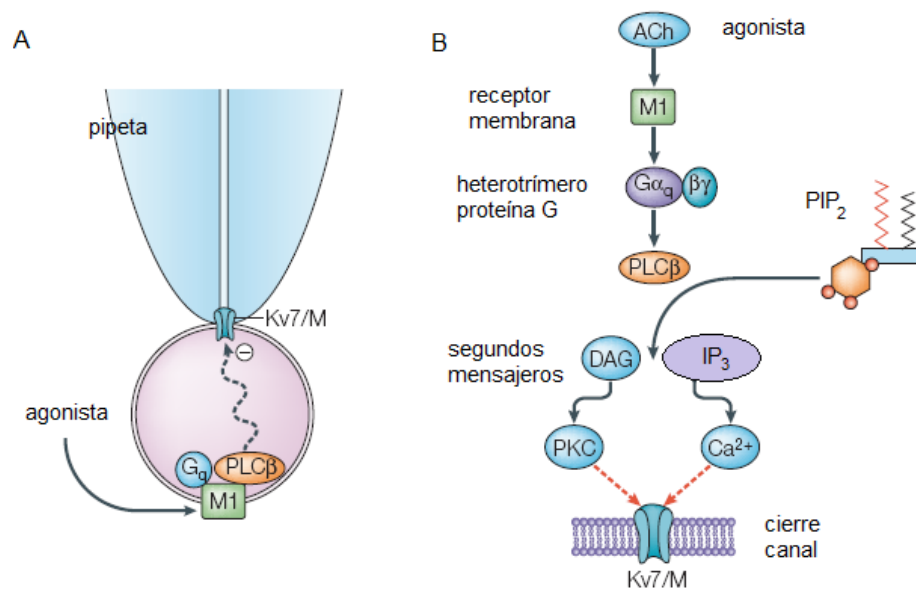
### 3.3 TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS DE ACETILCOLINA

En términos generales la unión de la acetilcolina a los receptores muscarínicos tiene su efecto sobre un canal iónico de forma indirecta. Canales constituidos por proteínas distintas al receptor que se ubican a cierta distancia del mismo (ver figura 1.22)

La activación del receptor muscarínico de ACh disminuye la cohesión de la proteína G con el mismo, produce la disociación y activación de la subunidad  $\alpha$  de la proteína G. Así como la formación del complejo  $\beta$ - $\gamma$ . Ya sea la subunidad  $\alpha$  ó el complejo  $\beta$ - $\gamma$  provocan la activación de enzimas que pueden tener efectos directos en la vía de señalización como fosforilaciones ó formación de mediadores entre ellos diacilglicerol, AMP cíclico e inositol trifosfato (ver figura 1.22) (Wess y cols, 2007).

En última instancia la activación de los receptores modula el funcionamiento de un canal iónico. Los mAChR subtipo M1 neuronales se encuentran asociados a la subunidad  $\alpha$  tipo  $G_{q/11}$ , la unión del ligando al receptor favorece la activación de la fosfolipasa C  $\beta 1$  y el cierre de un canal iónico (Suh y cols, 2004). Lo que produce una reducción en la conductancia de potasio tornando la neurona colinoceptiva más susceptible a otras señales excitatorias (Hille, 1994; Xiong y cols, 2008).

La principal isoenzima de la fosfolipasa C a nivel cerebral es la  $\beta$  cuyo sustrato es el fosfatidilinositol-4,5- bifosfato (PIP<sub>2</sub>), el cual se forma a partir del fosfatidilinositol (PI). El cual se localiza en la parte interna de la membrana celular y requiere de una serie de fosforilaciones

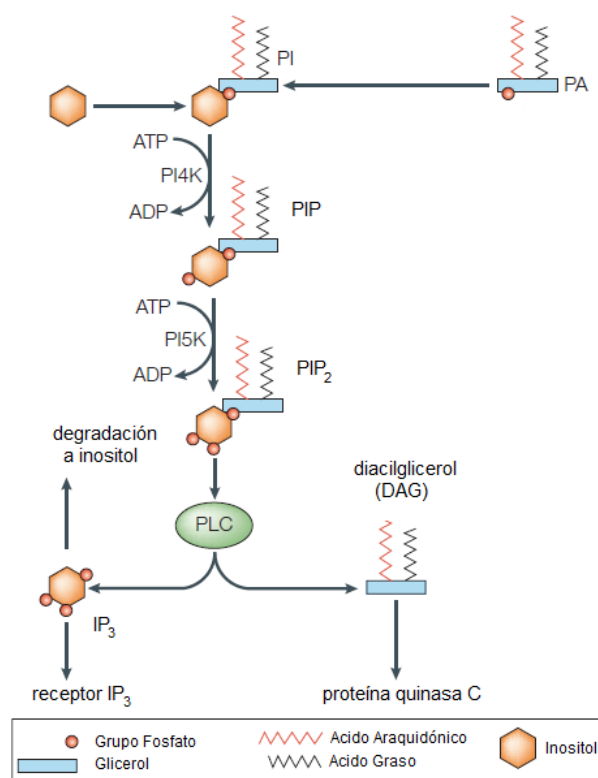


**Figura 1.22 Señalización remota de los receptores muscarínicos y vía de señalización del receptor muscarínico subtipo M1.** A. La estimulación remota de los mAChRs M1 por parte de un agonista fuera de la región delimitada por la pipeta de patch clamp (célula adherida), cierra los canales que regulan la corriente M (Kv7) en la región delimitada por la pipeta de patch clamp. Gq: proteína G acoplada a receptor muscarínico, PLC  $\beta$ : fosfolipasa C  $\beta$  asociada a la membrana. B. Vía señalización del receptor muscarínico subtipo M1 y su efecto modulador sobre los canales de potasio (Kv7/M). ACh: acetilcolina, Gq  $\beta\gamma$ : proteína G acoplada a receptor muscarínico, PLC  $\beta$ : fosfolipasa C  $\beta$  asociada a la membrana, DAG diacilglicerol, Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>: inositol trifosfato, PKC: proteína quinasa C, Ca<sup>2+</sup>: ión calcio. Fuente: Adaptado de Delmas y Brown, 2005.

para convertirse en PIP<sub>2</sub>. Inicialmente el PI es sustrato de la fosfatidilinositol quinasa (PI quinasa) convirtiéndolo en fosfatidilinositol 4 fosfato (PIP), seguidamente la PIP quinasa incorpora otro grupo fosfato en la posición 5 del PIP formando el fosfatidilinositol-4,5- bifosfato (PIP<sub>2</sub>). El PIP<sub>2</sub> es un fosfolípido de membrana que representa alrededor del 1% de la totalidad de los fosfolípidos de la membrana celular. Al tener carga negativa le permite interactuar con

los aminoácidos positivos proximales de la región carboxilo terminal intracelular de las subunidades Kv7 que componen del canal de potasio (ver figura 1.26) (Nakajo y Kubo, 2005, Miceli y cols, 2008). Una vez formado el PIP<sub>2</sub>, la PLC  $\beta$  de la membrana favorece la ruptura del mismo en dos dando origen al inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG) (ver figura 1.23).

La degradación del IP<sub>3</sub> se lleva a cabo por medio de fosfatasa que lo desfosforilan progresivamente hasta inositol. En el caso del DAG la degradación inicia con una fosforilación a ácido fosfatídico que interactúa con citosin trifosfato y se reincorpora al ciclo.

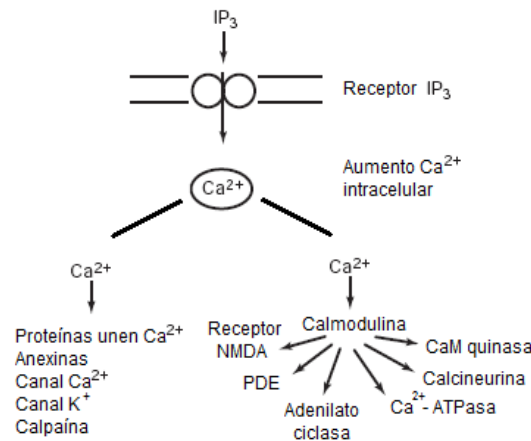


**Figura 1.23 Formación del fosfatidilinositol-4,5- bifosfato (PIP<sub>2</sub>) y efecto de la fosfolipasa C (PLC).** PA: ácido fosfatídico, PI: fosfatidilinositol, PI4K: fosfatidilinositol-4-quinasa, PI5K: fosfatidilinositol-5-quinasa, PIP: fosfatidilinositol-4-fosfato, PIP<sub>2</sub>: fosfatidilinositol-4,5- bifosfato, PLC : fosfolipasa C, DAG diacilglicerol, IP<sub>3</sub>: inositol trifosfato, ATP: adenosin trifosfato, ADP: adenosin bifosfato. Fuente: Adaptado de Delmas y Brown, 2005.

El DAG es una molécula hidrofóbica que se mantiene cerca de la membrana, mientras que el IP<sub>3</sub> por su naturaleza hidrosoluble es capaz de difundir en el citoplasma e interactuar con receptores específicos a nivel del retículo endoplasmático. Estructuralmente los receptores de IP<sub>3</sub> son canales iónicos que permiten el flujo de calcio. Están conformados por cuatro

subunidades, específicamente glicoproteínas de membrana que poseen en el extremo citoplasmático amino terminal un único sitio de unión de IP<sub>3</sub> (Schulman y Roberts, 2008).

La activación de receptores IP<sub>3</sub> en neuronas piramidales de la corteza y del hipocampo favorece la liberación interna de calcio lo que genera un aumento en la concentración citoplasmática del mismo (Power y Sah, 2002; Stutzmann y cols, 2004; Watanabe y cols, 2006). Un aumento de la concentración intracelular de calcio también podría producirse por la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje activados por la despolarización neuronal inducida al estimular los receptores muscarínicos M1 (Caulfield, 1993).

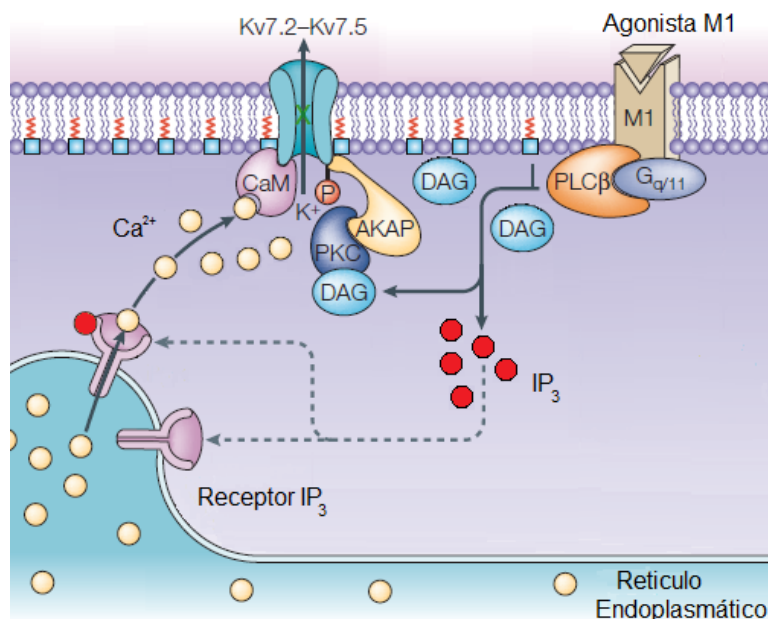


**Figura 1.24 Principales efectos directos e indirectos de la liberación de calcio intracelular.** IP<sub>3</sub>: inositol trifosfato, Ca<sup>2+</sup>: ión calcio, CaM quinasa: proteína quinasa dependiente de calcio calmodulina, Ca<sup>2+</sup>-ATPasa: bomba de calcio a nivel de membrana, PDE: fosfodiesterasa, Receptor NMDA: receptor glutamato tipo NMDA, K<sup>+</sup>: ión potasio. Fuente: Adaptado de Schulman y Roberts, 2008.

A nivel celular el calcio posee gran cantidad de acciones ya sea de forma directa ó como mediador (ver figura 1.24). Directamente es capaz de ejercer un efecto modulador sobre el receptor de IP<sub>3</sub> e inhibidor sobre el canal de potasio (Delmas y Brown, 2005). Indirectamente su acción se presenta por medio de la unión con la calmodulina proteína ubicua y abundante (Gamper y Shapiro, 2003, Miceli y cols, 2008), que carece de función enzimática intrínseca, sin embargo juega un papel determinante al modular la actividad de otros factores (ver figura 1.27). Mediante efectos en enzimas determinadas y cambios conformacionales (Schulman, 2004).

Debido a que la fosforilación de los canales de potasio presenta efectos cruciales en la fisiológica y el funcionamiento de dichos canales se considera que el cambio conformacional producido por la generación del complejo calcio - calmodulina favorece la fosforilación del canal

por medio de la PKC y la inhibición de la  $I_M$  (Park y cols, 2008). El mecanismo preciso mediante el cual el complejo calcio - calmodulina ejerce su efecto sobre los canales Kv7 no está del todo claro sin embargo la unión de la calmodulina a la región carboxilo terminal de los canales de potasio Kv7 es necesaria para el funcionamiento del canal (ver figura 1.25) (Wen y Levitan, 2002; Yus-Nájera y cols, 2002; Haitin y Attali, 2008). El grado de inhibición que ejerce el complejo calcio - calmodulina sobre los canales Kv7 depende de las subunidades que componen el canal aspecto que se ha comprobado mediante la sobreexpresión celular de calmodulina y su efecto en la  $I_M$  (Gamper y cols, 2005).



**Figura 1.25 Vía de señalización del receptor muscarínico M1.** M1: receptor muscarínico de acetilcolina subtipo M1,  $G_{q/11}$ : proteína G acoplada a receptor muscarínico, PLC  $\beta$ : fosfolipasa C  $\beta$  asociada a la membrana, DAG diacilglicerol,  $IP_3$ : inositol trifosfato, PKC: proteína quinasa C,  $Ca^{2+}$ : ión calcio,  $K^+$ : ión potasio, AKAP: proteína de anclaje de la quinasa A, Kv7.2 – Kv7.5: canales de potasio dependientes de voltaje expresados a nivel neuronal, P: fósforo, CaM: calmodulina. Fuente: Adaptado de Delmas y Brown, 2005.

La proteína quinasa C (PKC) en realidad constituye un grupo diverso de proteínas quinasas de naturaleza monomérica que presentan los dominios enzimáticos en un solo polipéptido y se encuentran asociadas a la vía de señalización del fosfatidilinositol. El DAG es capaz de interactuar y activar la PKC dependiente de calcio. La activación de la PKC a nivel neuronal se ha visto asociada a diversos efectos como: síntesis y secreción de neurotransmisores, alteraciones en la sensibilidad de receptores, funcionamiento del

citoesqueleto y plasticidad sináptica (Mesulam, 2004). Una vez activada la PKC se convierte en el principal efector sobre los canales de potasio Kv7, efecto que depende de la proteína de anclaje de la quinasa A (AKAP). La AKAP en condiciones normales se encuentra unida al canal, posee un sitio de unión para la PKC y es capaz de modificar la  $I_M$  (Marrion, 1997; Miceli y cols, 2008).

Cuando la PKC está unida a la AKAP su sitio enzimático se encuentra inaccesible a moléculas capaces de inhibir su función (Delmas y Brown, 2005). Sin embargo el efecto de la AKAP sobre la actividad del canal no está del todo claro (Nakajo y Kubo, 2005). El uso de inhibidores y activadores de la PKC como los ésteres de forbol sugieren un efecto parcial de la PKC sobre la actividad del canal cuya magnitud varía según el tipo específico de canal de potasio al cual se asocie (Marrion, 1997; Nakajo y Kubo, 2005).

La expresión de canales Kv7 y de receptores M1 en oocitos de *Xenopus* y en líneas celulares de mamífero ha permitido reconstituir la  $I_M$  y abordar sus mecanismos de regulación (Selyanko y cols, 2000; Shapiro y cols, 2000). Sin embargo el funcionamiento preciso y el aporte específico de cada mediador o segundo mensajero en algunas porciones de la vía de señalización no está del todo claro (Brown y cols, 2007; Miceli y cols, 2008).

Varios canales iónicos y proteínas transportadoras requieren la presencia de PIP2 a nivel de la membrana para su funcionamiento (Gamper y Shapiro, 2007). Esto ha llevado a que se considere la depleción de PIP2 de la membrana, como modulador del cierre del canal de potasio (Delmas y Brown, 2005). Ya que tanto una inhibición de la fosfoinositol - 4 – quinasa (PI4K) como una disminución de la cantidad de ATP hidrolizable al reducir la síntesis del PIP2 (ver figura 1.23) ocasionan una disminución de la  $I_M$  (Suh y Hille, 2002; Ford y cols, 2004). Asimismo un aumento en la síntesis de PIP2 por la sobreexpresión de la enzima fosfoinositol -5-quinasa (PI5K) (ver figura 1.23) disminuye la inhibición de la corriente M ( $I_M$ ) por parte de un agonista muscarínico (Li y cols, 2005; Winks y cols, 2005; Brown y cols, 2007). Otros estudios también han proporcionado evidencia sobre la función del canal de potasio y su relación con la reducción del PIP2 en la membrana (Zhang y cols, 2003; Robbins y cols, 2006; Brown y cols, 2007). Por lo que se considera que la presencia de PIP2 en la membrana ejerce un efecto alostérico a nivel del canal favoreciendo el estado abierto.

Aunque existe gran cantidad de evidencia que sustenta el efecto del PIP2 sobre los canales Kv7 el mecanismo molecular detrás esta hipótesis no está definido (Li y cols, 2005; Gamper y Shapiro, 2007). Se considera que los canales de potasio dependientes de voltaje Kv7

presentan una modulación recíproca donde su actividad es promovida por el PIP2 e inhibida por el complejo calcio – calmodulina. Sin embargo se considera al cambio de voltaje consecuencia de movimientos iónicos como el principal responsable de la actividad de estos canales (Haitin y Attali, 2008).

La interacción del PIP2 con las distintas subunidades que componen los canales de potasio Kv7 es variable. El fosfolípido de membrana posee una alta capacidad de interacción con canales compuestos únicamente por subunidades Kv7.3, mientras que para los constituidos sólo por subunidades Kv7.2 es baja (Selyanko y cols, 2001; Li y cols, 2004). Debido a lo anterior, variaciones en las cantidades de PIP2 en la membrana, producto de la hidrólisis por activación del receptor muscarínico, presentan efectos variables sobre el canal Kv7 que dependerán de la constitución del mismo y del tejido en que se localice (Delmas y Brown, 2005; Li y cols, 2005; Nakajo y Kubo, 2005).

### 3.4 CANALES DE POTASIO KCNQ ó Kv7

Los canales KCNQ ó Kv7 son canales de potasio dependientes de voltaje que presentan gran diversidad y se localizan en casi todo tipo de célula excitable (Shieh y cols, 2000; Gutman y cols, 2003; MacKinnon, 2003; Cooper, 2006). En términos generales se expresan en cerebro, corazón, tiroides, páncreas, oído interno, tracto digestivo, músculo esquelético y a nivel vascular del músculo liso (Yeung y cols, 2007; Maljevic y cols, 2010). Los canales Kv7 están constituidos por la unión de cuatro subunidades transmembrana (Gutman y cols, 2003). Cada subunidad codificada por un gen distinto denominados genes KCNQ, se ensambla de forma simétrica en la membrana para establecer el canal. La capacidad de formar canales homoméricos, heteroméricos y la presencia de variantes producidas como resultado del procesamiento postranscripcional (variantes *splicing*) contribuyen a aumentar la variabilidad del conjunto (Jentsch, 2000).

Las subunidades que integran los canales Kv7 comparten una estructura base de seis dominios transmembrana y un segmento formador de poro (6TMD-1P) sin embargo varían en el número total de aminoácidos. Se han descrito cinco tipos de subunidades (Kv7.1, Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4, Kv7.5) de acuerdo a sus propiedades estructurales, las cuales conservan un porcentaje de homología en la identidad de los aminoácidos constituyentes que varían entre un 30% y un 65%. Tanto el extremo amino terminal como el carboxilo terminal de las distintas subunidades

Kv7 se localizan a nivel intracelular (ver figura 1.26). En comparación con miembros de otras familias de canales Kv el extremo carboxilo terminal de los miembros Kv7 es bastante más extenso (Hernández y cols, 2008b), no obstante la longitud del mismo es variable entre las distintas subunidades Kv7 oscilando entre los 300 y los 500 aminoácidos (Miller, 2000; Howard y cols, 2007).

El extremo carboxilo terminal de las subunidades de los canales KCNQ conocido como el dominio de tetramerización está relacionado con el funcionamiento, ensamblaje, tráfico y expresión de subunidades. En este extremo existen varias regiones de interacción como: el “dominio A”, la región de asociación con PIP2 (Zhang y cols, 2003) y zonas de interacción con proteínas reguladoras como la calmodulina (Wen y Levitan, 2002; Haitin y Attali, 2008), AKAP (Hoshi y cols, 2003), la PKC y la ligasa de ubiquitina Nedd4-2. En el caso de las subunidades KCNQ 2 y KCNQ 3 el extremo carboxilo terminal presenta además una región de asociación con una proteína denominada ankirina G (ver figura 1.27) (Ekberg y cols, 2007; Haitin y Attali, 2008).

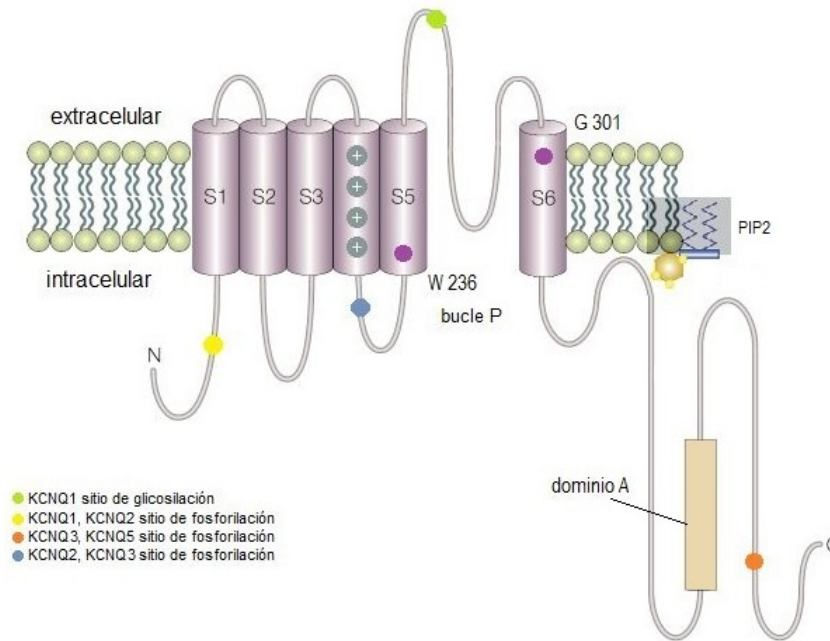
El “dominio A” a su vez presenta tres subdominios denominados cabeza, cola y secuencia de unión. La cola ó *sid* (*subunit interaction domain*) presenta la mayor variación y es la región que determina la especificidad de ensamblaje con otras subunidades, facilitando la formación de canales funcionales (Schwake y cols, 2003; Schwake y cols, 2006). Ligeras mutaciones en el “dominio A” pueden afectar tanto el ensamblaje como el funcionamiento del canal (Howard y cols, 2007; Hernández y cols, 2008a; Hernández y cols, 2008b).

Tanto en el extremo amino terminal como en el carboxilo terminal y el bucle P de las distintas subunidades Kv7 se presentan regiones susceptibles a sufrir fosforilaciones y glicosilaciones que pueden modular la actividad del canal (ver figura 1.26) (Robbins, 2001; Surti y cols, 2005).

Los dominios transmembrana están compuestos por hélices  $\alpha$  y se denominan S1, S2, S3, S4, S5, y S6 de acuerdo a su localización con respecto al extremo amino terminal (ver figura 1.26). El dominio transmembrana S4 es el principal constituyente del sensor de voltaje, este posee residuos aminoácidos con carga positiva que se conservan a lo largo de todas las subunidades de la familia Kv7, capaces de detectar cambios en la composición iónica del medio y originar un cambio conformacional del poro (Tombola y cols, 2006). Los dominios transmembrana S5 y S6 son los principales componentes del poro y se encuentran unidos por una secuencia de aminoácidos que forma un bucle o lazo extracelular. Este bucle constituye parte integral del poro y contribuye con la selectividad del mismo (Robbins, 2001).



Las subunidades del canal de potasio involucradas en la formación del poro o que funcionan como sensores de voltaje se denominan subunidades  $\alpha$ , mientras que las que forman

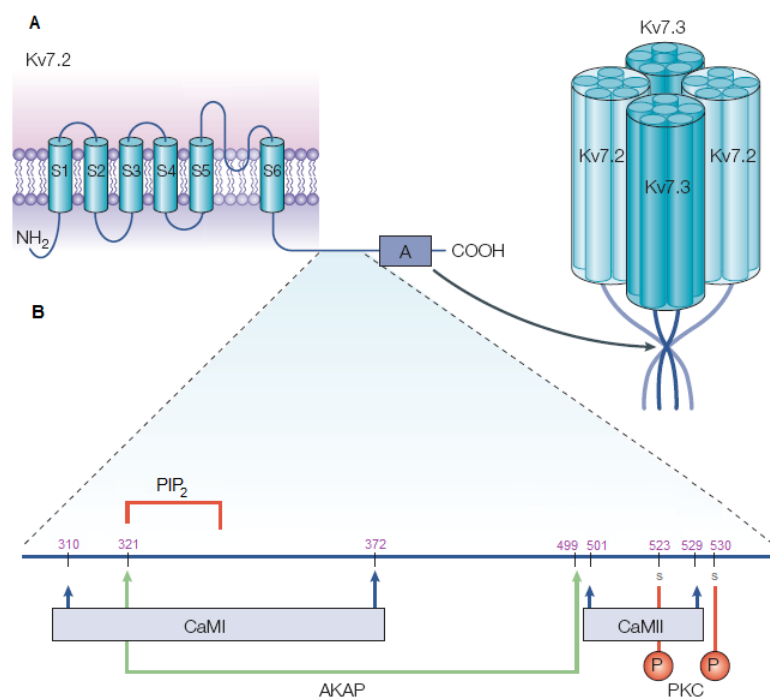


**Figura 1.26 Esquema general de las subunidades proteicas del canal de potasio KCNQ.** En el diagrama se muestran las estructuras características de las subunidades que componen los canales de potasio voltaje dependiente y posibles sitios de modificación según el tipo de subunidad. El segmento transmembrana S4 es el principal constituyente del sensor de voltaje y se representa con cargas positivas. El extremo carboxilo terminal presenta una extensión variable dependiente del tipo de subunidad, en él se representa la zona de interacción denominada como dominio A. El sitio de unión del fosfatidilinositol-4,5- bífosfato (PIP2) a la subunidad se presenta en la región proximal del extremo caboxiterminal sin embargo el sitio exacto de esta interacción no se conoce. En los segmentos transmembrana S5 y S6 respectivamente se presentan dos aminoácidos W236 y G301 (posición hace referencia al subunidad KCNQ2) esenciales para que la retigabina ejerza su efecto (ver más adelante). S1, S2, S3, S5, S6: dominios transmembrana, N: extremo amino terminal, C: extremo carboxilo terminal, bucle P: secuencia de aminoácidos que forma parte integral del poro y une los segmentos S5 y S6. Fuente: Modificado: Jentsch, 2000 y Miceli y cols, 2008.

parte del canal pero no se encuentran directamente relacionadas con estas funciones se denominan subunidades  $\beta$  ó accesorias (Robbins, 2001; Xiong y cols, 2008) y pueden o no ser del tipo KCNQ. Existen ocho familias de genes que codifican subunidades  $\alpha$  de los canales de potasio Kv7.

La asociación de subunidades Kv7 puede ocurrir entre el mismo tipo formando homotetrámeros ó entre distintos tipos de subunidades; ya sea de la misma familia (Kv7) ó de otra (Kv11, KCNE2); produciendo heterotetrámeros. A nivel cardíaco canales formados por subunidades  $\alpha$  tipo Kv7.1 y subunidades  $\beta$  tipo KCNE1 modulan la corriente denominada  $I_K$  (Jespersen y cols, 2005).

La capacidad y preferencia de formar heterotetrámeros entre subunidades KCNQ es variable. Subunidades tipo KCNQ1 no son capaces de formar canales funcionales con ningún otra subunidad KCNQ; las subunidades KCNQ3 son las que presentan la mayor cantidad de relaciones, asociándose con KCNQ2, KCNQ4 y KCNQ5. Mientras los segmentos transmembrana tipo KCNQ4 son incapaces de asociarse a los KCNQ2 y los KCNQ5 sólo lo hacen con subunidades KCNQ4 y KCNQ3 (Robbins, 2001; Howard y cols, 2007).



**Figura 1.27 Ensamblaje de subunidades de los canales Kv7.** A: Estructura transmembrana de la subunidad Kv7.2 y formación de heterotetrámeros con subunidades Kv7.3 por medio del dominio A. B: Extremo carboxilo terminal de la subunidad Kv7.2 donde se muestran regiones de unión con proteínas que regulan función, tráfico y ensamblaje, como los dos posibles sitios de unión de calmodulina (CaM I y CaM II). La existencia de traslapes en la región de unión con proteínas reguladoras específicamente de entre la CaM I y el PIP<sub>2</sub> sugiere una regulación recíproca de los canales Kv7. S1, S2, S3, S4, S5, S6: dominios transmembrana, NH<sub>2</sub>: extremo amino terminal, COOH: extremo carboxilo terminal, PIP<sub>2</sub>: sitio de interacción con el fosfatidilinositol-4,5- bífosfato, AKAP: sitio de unión de la proteína de anclaje de la quinasa A, s: residuos de serina, PKC: sitios de fosforilación por la proteína quinasa C. Fuente: Adaptado de Delmas y Brown, 2005.

La expresión de las distintas subunidades Kv7 de los canales de potasio en los diferentes tejidos es variable, aspecto que se encuentra relacionado con la interacción del extremo carboxilo terminal de las subunidades con la ligasa de ubiquitina Nedd4-2, ya que ésta regula la expresión a nivel de la superficie celular (Abriel y Staub, 2005; Ekberg y cols, 2007).

Los canales compuestos por subunidades Kv7.1 no se expresan a nivel de sistema nervioso, presentan una distribución restringida a corazón, páncreas, tracto gastrointestinal, tiroides y tejidos epiteliales (Brown y cols, 2007; Maljevic y cols, 2010). Mientras subunidades Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4 y Kv7.5 sí se distribuyen en el sistema nervioso localizándose a nivel axonal (Devaux y cols, 2004), entre nodos (Pan y cols, 2006) y en terminales presinápticos (Martire y cols, 2007). Sin embargo la expresión neuronal de las subunidades presenta diferencias considerables (Cooper y cols, 2000). Así canales constituidos por subunidades Kv7.4 están presentes predominantemente en el sistema auditivo-vestibular y en neuronas dopaminérgicas del sistema nervioso central (Hansen y cols, 2008).

La apertura de los canales de potasio KCNQ permite la salida de potasio del interior celular por gradiente electroquímico, esta corriente de iones positivos actúa como un amortiguador de la despolarización neuronal al acercar el potencial de membrana al potencial de equilibrio del potasio ( $E_K \approx -100\text{mV}$ ) (Martire y cols, 2004).

Mutaciones en las subunidades de los canales KCNQ, de sólo un aminoácido en la porción más estrecha del poro pueden no afectar el ensamblaje pero sí son suficientes para afectar el paso iónico por el canal alterando la magnitud de la  $I_M$  por ende el potencial de la membrana y la excitabilidad celular (Cooper, 2006). Alteraciones descritas en los genes que codifican cuatro de las cinco subunidades conllevan una disfunción de canales y se relacionan con canalopatías hereditarias como: arritmias cardíacas, convulsiones neonatales, neuromiotonía y sordera (ver tabla 1.4) (Benatar, 2000; Maljevic y cols, 2008; Maljevic y cols, 2010).

Gran cantidad de estudios han demostrado que los canales Kv7 son capaces de regular la corriente selectiva de iones potasio denominada  $I_M$  ó corriente M que se activa por la despolarización de la membrana (Brown y Adams, 1980; Adams y cols, 1982; Halliwell y Adams, 1982; Brown y Selyanko, 1985; Gahwiler y Brown, 1985; Hong-Sheng y cols, 1998). La  $I_M$  es una corriente de potasio dependiente de voltaje que se caracteriza por el efecto inhibitorio de los agonistas muscarínicos sobre la misma (Marrion, 1997). Actualmente es conocido que numerosos ligandos por medio de distintos receptores (cannabinoides, bradicinina, histamina o el receptor  $\sigma$ ) (Cruzblanca y cols, 1998; Soriani y cols, 1999; Schweitzer, 2000; Guo y Schofield, 2002), vías de señalización (PLC, calcio, fosforilación, moduladores directos) (Haley y cols, 2000, Hernández y cols, 2008b) son capaces regular la  $I_M$ . A su vez modificaciones covalentes en las subunidades Kv7 y enzimas no pertenecientes a una vía de señalización específica

Tabla 1.4 Subunidades de los canales Kv7, localización, gen codificante, subunidades de asociación, corriente regulada, función y canalopatías asociadas.

SUBUNIDAD	PRINCIPALES SITIOS EXPRESIÓN	GEN	LOCUS	SUBUNIDADES $\alpha$ ó $\beta$	CORRIENTE O CANAL	FUNCIÓN	PATOLOGÍA
Kv7.1	Corazón, Cóclea, Intestino, riñón	KCNQ1	11p15.5	KCNE1*, KCNE3	Rectificador tardío $I_{ks}$	Repolarización P.A. Transporte K <sup>+</sup>	Síndrome prolongación QT (RWS) Sordera congénita (JLNS)
Kv7.2	Cerebro Ganglios espinales	KCNQ2	20q13.3	Kv7.3*	$I_M$	Control excitabilidad	Epilepsia Neonatal Familiar Benigna (BFNC)
Kv7.3	Cerebro Ganglios espinales	KCNQ3	8q24	Kv7.2*, Kv7.5	$I_M$	Control excitabilidad	Epilepsia Neonatal Familiar Benigna (BFNC)
Kv7.4	Cóclea, Células vestibulares, Núcleo tronco del encéfalo	KCNQ4	1p34	Kv7.3	$I_K$ células ciliadas cóclea vestibular	Transporte K <sup>+</sup>	Sordera congénita (DFNA2)
Kv7.5	Cerebro Ganglios espinales Músculos	KCNQ5	6q14	Kv7.3	IM ?	Control excitabilidad ?	

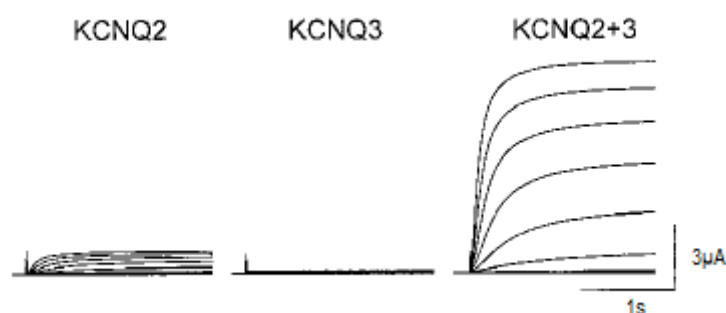
\* Indica que esta proteína se asocia a la subunidad en cuestión en el tejido afectado por la patología y que mutaciones en esta proteína pueden ser causantes de la misma canalopatía. ?: establece un posible involucramiento.  $I_{KS}$ : corriente de potasio a nivel cardíaco,  $I_M$ : corriente M,  $I_K$ : corriente potasio, P.A.: potencial de acción, K<sup>+</sup>: iones potasio, QT: intervalo QT cardíaco, RWS: Síndrome Romano-Ward, JLNS: Síndrome de Jervell y Lange Nielsen, BFNC: Epilepsia Neonatal Familiar Benigna, Sordera tipo DFNA2: sordera congénita progresiva de tipo autosómica dominante. Fuente: Adaptado Jentsch, 2000; Shieh y cols, 2000; Maljevic y cols, 2008 y Brown y Passmore, 2009.

como las proteína tirosina quinasas *Src* pueden actuar como moduladores de la  $I_M$  (Li y cols, 2004; Salter y Kalia, 2004; Haitin y Attali, 2008). Los aspectos anteriores y la capacidad de otros canales de potasio dependientes de voltaje tipo rectificadores, hERG (Kv 11.1 -11.3) de modular la  $I_M$ , aumentan la complejidad de la misma (Papa y cols, 2003; Guasti y cols, 2005; Elmedyby y cols, 2007).

La  $I_M$  presenta una cinética de activación relativamente lenta en respuesta a la despolarización y un efecto mantenido hasta que finaliza el estímulo que la ha activado; razón por la cual se le denomina “no inactivable” (Caulfield y cols, 1994, Maljevic y cols, 2010). El umbral de activación de la  $I_M$  es bajo (Brown y cols, 2007), inicia su activación a valores menores al potencial de membrana (-70mV ~ -60 mV) (Robbins, 2001; Lamas, 2005; Xiong y cols, 2008) y a valores de -30 mV se encuentra totalmente activa (Brown, 1988, Rivera-Arconada, 2004). Es decir esta corriente se encuentra parcialmente activa a valores cercanos del potencial de membrana en reposo lo que favorece una disminución en la excitabilidad celular (Hernández y cols, 2008b).

En el sistema nervioso los principales canales Kv7 que median la corriente M son los homotetrámeros y/o heterotetrámeros de las subunidades Kv7.2, Kv7.3, y Kv7.5 (Lerche y cols, 2000; Schroeder y cols, 2000; Cooper y cols, 2001; Roche y cols, 2002; Hadley y cols, 2003;

Wuttke y cols, 2008). Siendo los heterotetrámeros formados por Kv7.2 y Kv7.3 la expresión neuronal más frecuente (Li y cols, 2005; Brown y cols, 2007; Wuttke y cols, 2008) a nivel de hipocampo, corteza, cerebelo y ganglios basales (Cooper y cols, 2001; Hansen y cols, 2008). La localización subcelular de los canales también es determinante en la función de los mismos, así las configuraciones que regulan la  $I_M$  a nivel de las neuronas piramidales del hipocampo presentan una mayor distribución en zonas perisomales como en los segmentos iniciales del axón (Devaux y cols, 2004; Pan y cols, 2006; Hu y cols, 2007) y una amplitud de corriente más de 10 veces mayor al compararla con la de sus tetrámeros homoméricos (ver figura 1.28) (Rivera, 2006; Maljevic y cols, 2010).



**Figura 1.28 Corrientes generadas por cambios de voltaje en oocitos de *Xenopus* que expresan canales KCNQ.** Variaciones escalonadas en el voltaje de 10mV de magnitud y 2 segundos de duración generan corrientes de diferente amplitud según la composición de los canales. Las corrientes observadas en oocitos KCNQ3 no muestran diferencia con respecto a oocitos donde no existe variación de voltaje. KCNQ2: tetrámeros homómeros constituidos por subunidades KCNQ2, KCNQ3: tetrámeros homómeros constituidos por subunidades KCNQ3, KCNQ2+3: tetrámeros heterómeros constituidos por subunidades KCNQ2 y KCNQ3. Fuente: Modificado de Wang y cols, 1998.

La  $I_M$  controla la excitabilidad neuronal al regular el potencial de membrana entre descargas, estrechar el potencial de acción y modular disparos espontáneos (Martire y cols, 2004; Lamas, 2005; Miceli y cols, 2008; Rogawski, 2008). Asimismo la corriente M también se ha relacionado con funciones de memoria y aprendizaje debido a la capacidad de regular ondas theta a nivel hipocampal (Hu y cols, 2002; Peters y cols, 2005; Hu y cols, 2007). La adaptabilidad en la frecuencia de disparos repetitivos se debe a la activación y cinética de la  $I_M$ , lo que suprime potenciales de acción posteriores y trenes de disparos por despolarizaciones sostenidas tanto en duración como frecuencia. (Miceli y cols, 2008; Brown y Passmore, 2009). La  $I_M$  a su vez interviene en la generación de la posthiperpolarización media (mAHP) que contrarresta la postdespolarización (ADP) luego de descargas únicas o múltiples.

En neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo los bloqueantes de los canales KCNQ como la linopiridina, el XE991 y el bario (Brown, 1988; Yajeya y cols, 1999) promueven la despolarización celular, disminuyen la mAHP, aumentan la ADP y favorecen disparos en forma de ráfagas (ver tabla 1.5 y figura 4.1) (Yue y Yaari, 2004; Gu y cols, 2005; Vervaeke y cols, 2006; Chen y Yaari, 2008).

A nivel neuronal después de la generación de un potencial de acción se produce una postdespolarización mediada por la presencia de una corriente persistente de entrada de iones sodio, la  $I_M$  contrarresta esta situación modulando la frecuencia y las características de la descarga. La presencia de una mayor densidad de canales Kv7, específicamente aquellos que contienen la subunidad Kv7.3 en la región inicial del axón (zona de generación del potencial de acción) es regulada por la interacción del segmento carboxilo terminal de las subunidades Kv7.3 y Kv7.2 con la ankirina G (Pan y cols, 2006; Rasmussen y cols, 2007). Dicha distribución contribuye a la regulación del potencial de membrana y del potencial umbral, aspecto fundamental en la supresión de disparos espontáneos (Romero y cols, 2004; Shah y cols, 2008).

La utilización de sustancias capaces de mantener abiertos los canales de potasio Kv7 como la retigabina un derivado de la flupirtina y algunos analgésicos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) son beneficiosos en caso de hiperexcitabilidad neuronal (ver figura 1.29) (Blackburn y cols, 2005; Peretz y cols, 2005, Peters y cols, 2005; Brown y Passmore, 2009). Estos datos abordan la posible utilidad de los canales KCNQ como diana farmacológica en la investigación y desarrollo de fármacos en el tratamiento de patologías asociadas a una alteración en los patrones de descarga como: epilepsia, ansiedad, dolor, migrañas, enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas (Wuttke y Lerche, 2006; Miceli y cols, 2008; Rogawski, 2008; French y cols, 2011).

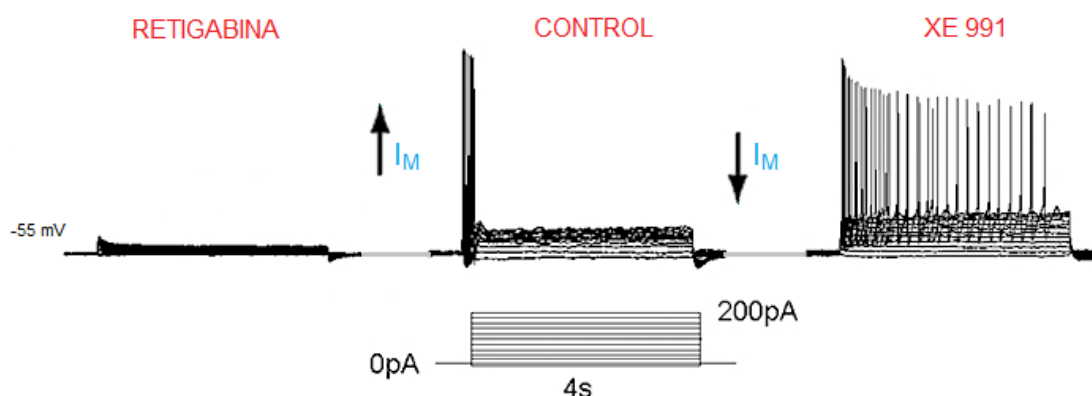
La retigabina estabiliza la configuración abierta de los canales Kv7.2 a Kv7.5, mediante la unión a un bolsillo hidrofóbico localizado entre los segmentos transmembrana S5 y S6, para que ocurra esta interacción es necesaria la presencia de un residuo de triptófano (W) en el segmento transmembrana S5, específicamente en la posición 236 (Kv7.2). Otros residuos como la glicina (G) en la posición 301 (Kv7.2) del segmento transmembrana S6 favorecen el efecto de la retigabina (ver figura 1.26). La estabilización del estado abierto de los canales favorece la iniciación de la  $I_M$  a valores menores a  $-70\text{mV}$  observándose un corrimiento hacia la izquierda en la curva de activación (corriente voltaje), un aumento en el tiempo durante el cual el canal

permanece abierto y una disminución por un factor de 10 en el tiempo durante el cual el canal está cerrado. Efectos que se ven eliminados en presencia de bloqueantes Kv7 como el XE991 en el medio (Maljevic y cols, 2008; Xiong y cols, 2008; Lange y cols, 2009).

A pesar de que la retigabina no afecta canales Kv7.1 cardíacos, ya que esta subunidad carece del residuo de triptófano en S5, su efecto no es selectivo para canales Kv7 neuronales, así canales constituidos por subunidades Kv7.2 - Kv7.5 en otras regiones pueden verse afectados. A dosis mayores la retigabina potencia corrientes mediadas por GABA<sub>A</sub> e inhibe de forma inespecífica varios tipos de corrientes inducidas (Van Rijn y Willems-Van Bree, 2003; Miceli y cols, 2008). En la actualidad se realizan esfuerzos en la investigación de moléculas con una mayor selectividad y especificidad por los canales Kv7 neuronales. También se buscan activadores de canales Kv7 más potentes, capaces de activar el canal a valores de potencial de membrana más bajos, aumentar la probabilidad del estado abierto y/o estabilizar dicha configuración abierta (i.e., análogos oxindólicos, fenamatos, acrilamidas, piritionato de zinc, y sustancias capaces de modificar covalentemente residuos de cisteína (C) de las subunidades Kv7). La modulación del tráfico y la expresión de las subunidades en la membrana donde se ha visto que la ligasa de ubiquitina Nedd4-2 es fundamental también se presenta como un posible abordaje (Xiong y cols, 2008; Haitin y Attali, 2008; Brown y Passmore, 2009).

El bloqueo de canales Kv7 a nivel neuronal ocasiona: una disminución en la  $I_M$ , un aumento en la resistencia de entrada, favorece la despolarización, aumenta la excitabilidad, y origina cambios en el patrón de descarga (ver figura 1.29) (Brown y Yu, 2000; Brown y Passmore, 2009). La inhibición de la  $I_M$  o la baja expresión de canales Kv7 ocasiona que neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo con un patrón de disparo único presenten disparos en ráfagas principalmente debido a un aumento en la postdespolarización (Yue y Yaari, 2004; Safiulina y cols, 2008). Aspectos que se comprueban al observar convulsiones espontáneas, hiperactividad y aumento en la excitabilidad neuronal en la región CA1 del hipocampo, en ratones transgénicos que expresan subunidades Kv7.2 mutantes (Peters y cols, 2005).

Los bloqueantes de canales KCNQ más estudiados son: el tetraetilamonio (TEA), el bario iónico, la linopiridina, XE991 y la caribdotoxina (ver tabla 1.5). Este tipo de compuestos generalmente no son selectivos para una corriente determinada ni específicos para un tipo de canal, mostrando diferencias en la inhibición de las corrientes de potasio.



**Figura 1.29 Respuesta neuronal al paso de corriente en distintas condiciones de conductancia de los canales KCNQ.** En la figura central se observa la generación de potenciales de acción en una célula al inyectar pulsos escalonados de corriente despolarizante con una duración de 4 segundos y una magnitud de 20 pA, la cual posee un potencial de membrana en reposo de -55 mV. A la izquierda se muestra el efecto de la retigabina que aumenta la apertura de los canales KCNQ por ende la magnitud de la  $I_M$ , contrarresta la despolarización y suprime la generación de potenciales de acción. Mientras que a la derecha se ejemplifica el efecto de los bloqueantes de canales KCNQ por medio del XE991 que disminuye la  $I_M$ , favorece la despolarización y promueve la generación de potenciales de acción. Fuente: Adaptado de Brown y Passmore, 2009.

**Tabla 1.5 Efecto de bloqueadores de canales de potasio sobre la  $I_M$ .**

INHIBIDOR	IC <sub>50</sub> INHIBICIÓN $I_M$	INHIBICIÓN MÁXIMA $I_M$ (%)	DESPOLARIZACIÓN (mV)
Ba <sup>2+</sup>	0,33 ± 0,02 mM	98,23 ± 0,88 (10mM)	9,24 ± 1,81 (1mM)
Oxo-M	1,70 ± 0,65 μM	63,32 ± 4,47 (10 μM)	10,30 ± 1,58 (10μM)
Linopiridina	2,82 ± 0,1 μM	84,99 ± 4,31 (30 μM)	2,27 ± 0,34 (10 μM)
XE 991	0,33 ± μM	98,19 ± 1,14 (10 μM)	3,00 ± 0,96 (3 μM)

Cifras entre paréntesis corresponden a la concentración del inhibidor. IC<sub>50</sub>: concentración inhibitoria media,  $I_M$ : corriente M, Ba<sup>2+</sup>: iones bario, Oxo-M: oxotremorina agonista sintético de receptores muscarínicos. Fuente: Adaptado Romero y cols, 2004.

El TEA bloquea: las corrientes de potasio mediadas por canales rectificadores tardíos ( $I_K$ ), la  $I_M$ , corriente de potasio activada por de calcio ( $I_C$ ), la corriente rectificadora de entrada ( $I_{K(IR)}$ ) y la corriente de potasio sensible a ATP ( $I_{K(ATP)}$ ) (Schnee y Brown, 1998). Específicamente los canales Kv7.2 homoméricos presentan una mayor sensibilidad a la acción del tetraetilamonio que los homómeros Kv7.3 mientras que los heterómeros de estas subunidades muestran sensibilidades intermedias. Debido a la presencia diferencial entre



subunidades de un aminoácido que una vez conformado el canal se ubica la región del poro (Hadley y cols, 2003; Maljevic y cols, 2008).

La 4-aminopiridina (4-AP) comúnmente utilizada para inducir actividad epileptiforme *in vitro* (Peña y Álvarez-Pérez, 2006) inhibe varios tipos de corrientes de potasio como la corriente transitoria ( $I_A$ ), la corriente sensible a 4-AP ( $I_D$ ), algunos tipos de  $I_K$  y la  $I_{K(ATP)}$  (Schnee y Brown, 1998), pero no la  $I_M$  (Cooper, 2006). El bario iónico es la sustancia comúnmente utilizada para inhibir la  $I_M$  a nivel extracelular mediante un bloqueo dosis dependiente (Brown y Selyanko, 1985; Selyanko y cols, 1999; Romero y cols, 2004).

En términos generales aparte del bloqueante utilizado se presentan diferencias considerables en la inhibición de la corriente que dependen principalmente de las subunidades que componen el canal Kv7, el tejido en que se localiza y la naturaleza o modificaciones en los aminoácidos que componen el bucle P de las distintas subunidades (Robbins, 2001).

La linopiridina junto con el XE991 y el DMP - 543 constituyen los bloqueantes Kv7 con mayor potencial en la aplicación clínica. La linopiridina es el compuesto referencia y fue el primero en mostrar posible uso clínico en la EA; con resultados preliminares prometedores en ciertos modelos animales donde se evaluó aprendizaje y memoria (Fontana y cols, 1994; Flagmeyer y Van der Staay, 1995). El XE991 y el DMP - 543 son derivados antracénicos de la linopiridina de mayor potencia (Zaczek y cols, 1998; Miceli y cols, 2008).

La utilización clínica de la linopiridina se vio limitada por las propiedades farmacocinéticas y la baja potencia. Además de la baja selectividad por las distintas combinaciones de tetrámeros que componen los canales Kv7 neuronales y la capacidad de producir efectos adversos proepilépticos como temores (Rockwood y cols, 1997, Miceli y cols, 2008). Por su parte el XE991 a concentraciones cercanas a los 100 $\mu$ M puede afectar canales de potasio dependientes de voltaje tipo hERG (Elmedy y cols, 2007).

La mejora cognitiva observada con la utilización de bloqueantes Kv7 en animales de experimentación se debe parcialmente a liberación de neurotransmisores como norepinefrina, aspartato, ácido  $\gamma$  - aminobutírico (GABA) y acetilcolina (Aiken y cols, 1995; Song y cols, 2009). Efecto mediado por la entrada de iones calcio (ver sección 3.0) a través de canales dependientes de voltaje a nivel presináptico debido a la supresión de la  $I_M$  en presencia de un estímulo despolarizante prolongado o repetido; aspecto que se ve favorecido por la cinética de activación de la  $I_M$  (Vickroy, 1993, Zaczek y Saydoff, 1993; Elmedy y cols, 2007; Mikiciuk-Olasik y cols, 2007; Moser y cols, 2008).

La administración de XE991 ha demostrado una mejora en el aprendizaje y memoria de animales de experimentación al disminuir el umbral necesario para la consolidación de la memoria y aumentar la eficacia sináptica. A su vez promueve la recuperación tanto de una depleción colinérgica como de una neurodegeneración inducida, favorece la síntesis de proteínas involucradas en la estabilización de la de memoria a largo plazo y la expresión de genes relacionados con el aprendizaje (Fontán-Lozano y cols, 2011).

La magnitud de inhibición de la  $I_M$  que producen la linopiridina y el XE991 es dependiente de voltaje e irreversible en caso del XE991, sin embargo todavía falta esclarecer aspectos fundamentales de la misma (Romero y cols, 2004; Elmedyb y cols, 2007). Así como el desarrollo de bloqueantes Kv7 más potentes, selectivos y específicos (Miceli y cols, 2008).

#### 4.0 ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

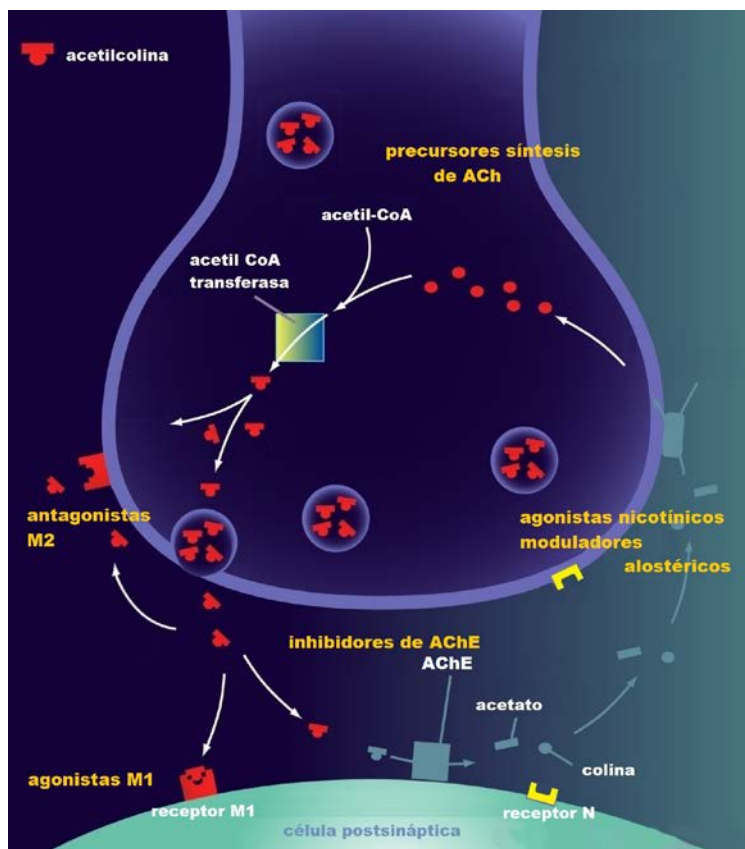
Es sabido que los fármacos que incrementan la transmisión colinérgica mejoran la memoria, mientras que los antagonistas colinérgicos la empeoran; así que el principal acercamiento para mejorar la función de la memoria en la EA ha sido aumentar de alguna manera la actividad colinérgica cerebral (Parnetti y cols, 2007).

Actualmente los tratamientos disponibles para abordar la demencia degenerativa primaria buscan: aumentar la concentración colinérgica a nivel sináptico (ver figura 1.30), prevenir la excitotoxicosis por glutamato (ver sección 1.4) ó presentan acercamientos hipotéticos antidemencia (antioxidantes, neuroprotectores, antiinflamatorios y agentes que mejoran la circulación) (ver figura 1.31).

Dentro de este último grupo se pueden mencionar la vitamina E, la selegilina y el extracto estandarizado de *Ginkgo biloba* (Boothby y Doering, 2005; Doraiswamy y Xiong, 2006; Doody y cols, 2008). Hasta la fecha ninguno de estos antioxidantes, neuroprotectores y sustancias nootrópicas ha mostrado beneficios importantes en el tratamiento de la EA (DeKosky y cols, 2008; Rafii y Aisen, 2009).

La terapéutica actual aprobada para el manejo de la EA (ver figura 1.31) es considerada por muchos como una medida paliativa ya que disminuye síntomas específicos como la agitación y la pérdida de memoria (Robichaud, 2006; Wilson y cols, 2011), favoreciendo una ligera mejora en la calidad de vida del paciente; sin embargo no existe ningún fármaco capaz de: aumentar la síntesis de la acetilcolina a nivel presináptico, detener o revertir el

proceso neurodegenerativo y proporcionar una mejora cognitiva en un porcentaje significativo de los pacientes (Roberson y Mucke, 2006; Sabbagh, 2009; Schneider y cols, 2011).

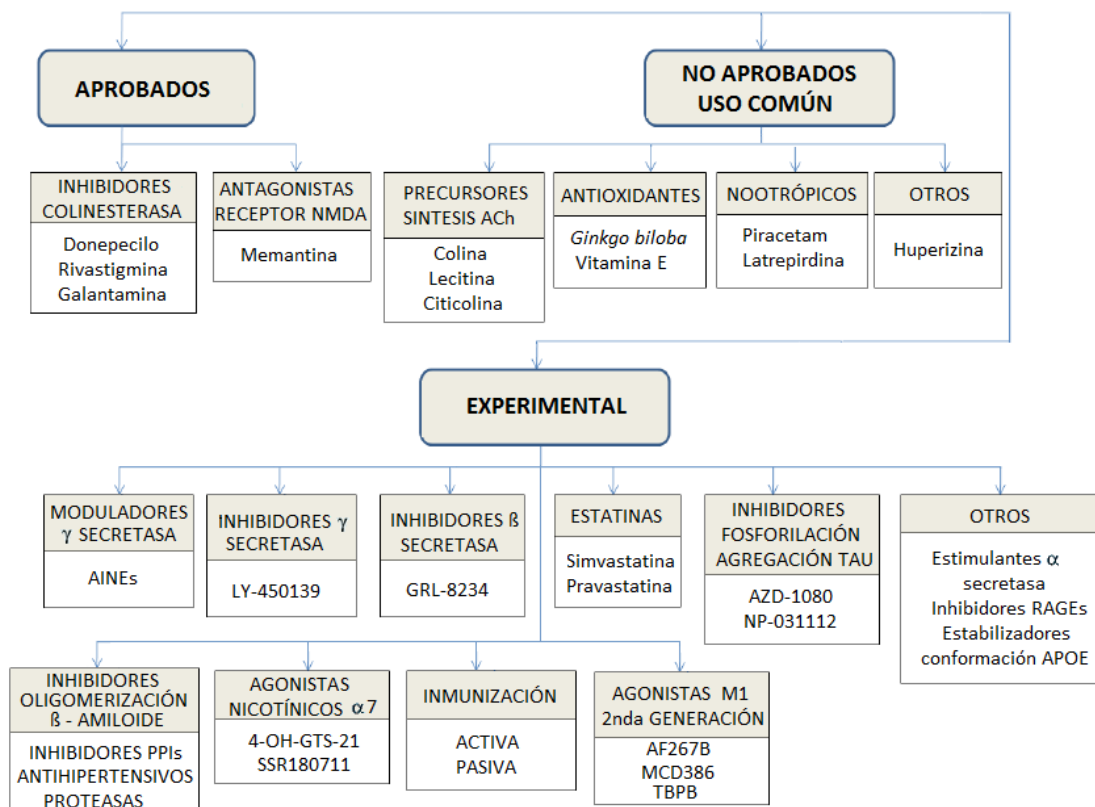


**Figura 1.30 Posibles dianas terapéuticas para mejorar la neurotransmisión colinérgica.** En naranja se representan las principales dianas terapéuticas actualmente utilizadas en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. ACh: acetilcolina, CoA: coenzima A, M1: mAChR subtipo M1, M2: mAChR subtipo M2, AChE: enzima acetilcolinesterasa, receptor N: receptor nicotínico de acetilcolina. Fuente: Adaptado del banco de imágenes del Lundbeck Institute, 2010. Reproducida bajo permiso Lundbeck Institute.

La terapéutica existente en el tratamiento de la EA se instaura una vez que ha iniciado la sintomatología por lo que algunos autores la denominan de prevención secundaria. Uno de los grandes retos en el tratamiento de la EA es la intervención terapéutica antes de que se presente la sintomatología, el deterioro cognitivo y/o la afectación colinérgica severa (Wilson y cols, 2011).

La presencia de procesos patobiológicos (disfunción en la autofagia, presencia de placas seniles y ovillos neurofibrilares) en una etapa presintomática que antecede entre 10 y 20 años al deterioro cognitivo (Potter, 2010; Marchesi, 2011) y la existencia de tratamientos

experimentales capaces detener o revertir el proceso neurodegenerativo sin que esto se acompañe de una mejora sintomática rápida del paciente (Citron, 2010; De Strooper y cols,



**Figura 1.31 Principales fármacos utilizados y en investigación para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.** Los fármacos denominados como aprobados se basa en los lineamientos de la *Food and Drug Administration* (FDA) de los EEUU. La cual establece el uso de inhibidores de la colinesterasa en casos leves a moderados y la utilización de antagonistas del receptor NMDA de glutamato para casos moderados a severos. ACh: acetilcolina, AINEs: analgésicos antiinflamatorios no esteroideos, RAGEs: receptores de productos avanzados de glicación, APOE: apolipoproteína E, PPIs: interacciones proteína – proteína, M1: receptores muscarínicos de acetilcolina subtipo M1.

2010); refuerzan la necesidad de una intervención oportuna. Así pruebas como: la determinación de marcadores en líquido cefalorraquídeo (Simonsen y cols, 2007; De Meyer y cols, 2010; Fukumoto y cols, 2010), determinaciones de la atrofia longitudinal del hipocampo por medio de imágenes de resonancia magnética y determinaciones del metabolismo de glucosa por medio de la tomografía por emisión de positrones que han demostrado valor predictivo en la determinación de pacientes con MCI que desarrollan EA (Hampel y cols, 2010), vienen a ser fundamentales en la instauración del tratamiento en la EA.

El abordaje precoz de pacientes que desarrollarán la EA también intensifica la necesidad de revisar los lineamientos actuales de diagnóstico (Dubois y cols, 2007; Dubois y cols, 2010) y

el desarrollo de pruebas diagnósticas de uso común (Cummings y cols, 2007; Walhovd y cols, 2010).

#### 4.1 PRECURSORES DE LA SÍNTESIS DE ACETILCOLINA

Este abordaje terapéutico busca aumentar la actividad colinérgica a nivel de la sinapsis mediante la administración de precursores de la síntesis de ACh. Sin embargo, el tratamiento de pacientes con EA con precursores colinérgicos principalmente colina y fosfatidilcolina (lecitina) no es satisfactorio. Los ensayos clínicos controlados con fosfatidilcolina inician en 1986 y los resultados concluyen que la administración de lecitina parece efectiva en problemas subjetivos de memoria pero no existen datos significativos que apoyen su uso en pacientes con demencia en edad adulta (Parnetti y cols, 2007).

Así el incremento en la concentración de colina a nivel cerebral producto de la administración de suplementos dietéticos de lecitina como principal fuente dietética de colina, no se correlaciona con un incremento significativo de la síntesis y/o la liberación de ACh a nivel neuronal. Tampoco se puede descartar que la administración exógena de colina ejerza un efecto preventivo al almacenarse en forma de fosfolípidos de membrana (Farlow, 2004; Scheltens y cols, 2010).

El uso de otros fosfolípidos implicados en las rutas biosintéticas de la colina, como la CDP-colina, la colina-alfoscerato y la fosfatidilserina sugiere un incremento en la síntesis y liberación de la ACh, habiéndose descrito una pequeña mejoría de las funciones cognitivas en pacientes de Alzheimer, sin embargo debido al número reducido de pacientes en estos estudios los resultados no son concluyentes (Parnetti y cols, 2007; Álvarez-Sabín y Román, 2011).

#### 4.2 AGONISTAS / ANTAGONISTAS DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS DE ACETILCOLINA

La utilización de agonistas del receptor M1 y antagonistas del receptor M2 mejoran el proceso cognitivo en animales de experimentación (Rowe y cols, 2003). Lo que sugiere que el fármaco ideal a este nivel es aquel capaz de estimular los receptores postsinápticos M1, M5 y antagonizar los receptores presinápticos M2 simultáneamente, combinación de efectos que se traduciría en un incremento en las funciones cognitivas (ver figura 1.30) (Fisher, 2007; Wess y cols, 2007; Fisher, 2008).

La conservación de los receptores M1 a nivel cortical en pacientes con Alzheimer, refuerza su empleo en el tratamiento de la EA (Knudsen, 2003; Mesulam, 2004; Small y Mayeux, 2005). Sin embargo, la eficacia clínica de los agonistas M1 denominados de primera generación ha sido baja debido: a que su utilización genera un beneficio no claro, a una baja biodisponibilidad oral, a una corta duración de acción, a un margen terapéutico estrecho y a una alta incidencia de efectos adversos producidos principalmente por la activación de los otros subtipos de receptores muscarínicos localizados a nivel intestinal, urinario y pulmonar (Jones y cols, 2008). Debido al alto grado de conservación de los sitios ortostéricos que poseen los receptores en cuestión (ver sección 3.2) (Thomas y cols, 2008; Avlani y cols, 2010).

Diversos estudios demuestran que los agonistas muscarínicos no solo promueven el desarrollo cognitivo de forma directa sin necesidad de un alto grado de conservación de la terminación nerviosa lo que aumenta su efectividad con respecto a los inhibidores de la acetilcolinesterasa (Potter, 2010), sino que la estimulación muscarínica selectiva (ortostérica ó alostérica) disminuye la producción del péptido  $\beta$ - amiloide evitando así su acumulación y neurotoxicidad. Dicha estimulación también se ha relacionado con la regulación de los cambios asociados a la taupatía (Fisher y cols, 2003; Oddo y cols, 2006; Wess y cols, 2007; Jones y cols, 2008; Schaeffer y Gattaz, 2008). Teoría que se ve reforzada al observar un aumento en la producción del péptido amiloide y de la taupatía al administrar dicitolmina (antagonista M1 selectivo) a ratones transgénicos (Caccamo y cols, 2006).

El mecanismo por el cual los agonistas M1 pueden influir en el desarrollo de la EA no está del todo claro, se sugiere que favorecen la producción del péptido soluble al estimular la actividad  $\alpha$  – secretasa por medio de la activación de vías de señalización en las que intervienen quinasas como: la PKC, la ERK1, y ERK2; e incrementar la expresión de la ADAM 17. La disminución en la fosforilación de la proteína  $\tau$  producto de la activación de los receptores M1 se asocia a una reducción en la actividad de la GSK-3 $\beta$  (Schaeffer y Gattaz, 2008; Holtzman y cols, 2011; Thathiah y De Strooper, 2011).

El desarrollo de agonistas ortostéricos y agonistas o moduladores alostéricos del receptor M1 con mayor selectividad denominados agonistas M1 de segunda generación han demostrado tolerabilidad y eficacia en estudios que utilizan diversas escalas de aprendizaje y conducta (Jones y cols, 2008; Wittmann y cols, 2008; Conn y cols, 2009; Digby y cols, 2010).

### 4.3 AGONISTAS RECEPTORES NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA

Debido a que la administración de nicotina y agonistas nicotínicos mejoran la memoria, el aprendizaje y evidencian efectos neuroprotectores tanto *in vivo* como *in vitro*, surge la hipótesis que agonistas de los receptores nicotínicos podrían tener utilidad clínica en enfermedades neurodegenerativas. Agonistas nicotínicos se asocian a una prevención de la oligomerización del péptido amiloide, protección de las neuronas corticales de la toxicidad del  $\beta$  – amiloide y de la excitación tóxica de glutamato (Shankar y cols, 2007; Shimohama, 2009; Potter, 2010).

Sin embargo dos inconvenientes principales han hecho que su paso a la clínica sea comprometido: el efecto desensibilizador de los propios receptores nicotínicos y los efectos secundarios asociados a la activación de los receptores nicotínicos periféricos principalmente a nivel de  $\alpha 3$  (alteraciones gastrointestinales y cardiovasculares).

El efecto desensibilizador de los agonistas nicotínicos modifica la expresión de los receptores lo que dificulta determinar su utilidad en tratamientos crónicos (Buckingham y cols, 2009). Desensibilización dependiente tanto de la concentración de agonista nicotínico como de la duración del tratamiento (Albuquerque y cols, 2001).

Debido a que la mayoría de los agonistas nicotínicos actualmente utilizados en clínica son inespecíficos (Arneric y cols, 2007; Steensland y cols, 2007), se investigan agonistas más selectivos para los receptores  $(\alpha 7)_5$  y  $\alpha 4\beta 2$  ya que son los dos subtipos más abundantes en el SNC. Además los receptores nicotínicos  $(\alpha 7)_5$  se relacionan con procesos de neuroprotección (D'Andrea y Nagele, 2006) y modulación de neurotransmisores (Ren y cols, 2007; Söderman y cols, 2008). Asimismo este tipo de receptores presentan elevada disfunción debido a su gran afinidad con péptido  $\beta$ - amiloide (Butterfield y cols, 2006; Schliebs y Arendt, 2010). Mientras los  $\alpha 4\beta 2$  se relacionan con mejoras en el aprendizaje y la memoria (Baker y cols, 2009; Lenz y cols, 2009).

Otros acercamientos incluyen el desarrollo de sustancias que favorezcan tanto un aumento en la expresión como en la actividad de receptores  $(\alpha 7)_5$  y  $\alpha 4\beta 2$  (Popa y cols, 2006; Albuquerque y cols, 2009), así como el uso sinérgico de agonistas nicotínicos y antagonistas de M2.

#### 4.4 INHIBIDORES DE LA ACETILCOLINESTERASA

Los inhibidores de la acetilcolinesterasa evitan la degradación de la acetilcolina, siendo la única estrategia farmacoterapéutica que ha demostrado hasta el momento cierta eficacia para aminorar la sintomatología de la EA. Sin embargo estos fármacos mejoran la memoria en un porcentaje discreto de pacientes con EA leve ó moderada y no modifican el progreso de la patología (Lleó y cols, 2006; Roberson y Mucke, 2006).

A su vez la efectividad de los inhibidores de la acetilcolinesterasa desciende a medida que progresa la enfermedad ya que su efecto depende del estado funcional de las terminaciones nerviosas las cuales degeneran a medida que la enfermedad progresa (Standridge, 2004; Caccamo y cols, 2006; Potter, 2010).

Estos fármacos inhiben de forma reversible la acetilcolinesterasa cerebral evitando la degradación del neurotransmisor y favoreciendo la elevación de los niveles de acetilcolina en la hendidura sináptica. La inhibición que producen estos agentes es relativamente inespecífica ya que no solo inhiben la acetilcolinesterasa cerebral sino también otras colinesterasas como la butirilcolinesterasa (Jacobsen y cols, 2005). La elevación sináptica de la ACh conlleva un aumento en los efectos no selectivos del neurotransmisor que se ven reflejados tanto a nivel nicotínico como muscarínico. Contribuyendo a la presencia de efectos adversos y no deseados; como la estimulación de los receptores muscarínicos M2 y M4 relacionados con la generación de formas amiloideas del péptido amiloide (Davis y cols, 2010; Potter, 2010).

La fisostigmina es el primer inhibidor de la acetilcolinesterasa con más de 100 años de existencia, la cual igual que la neostigmina por una inhibición de la acetilcolinesterasa periférica producen hiperactividad colinérgica periférica que se refleja con náuseas, vómitos, diarreas, calambres abdominales e hipersecreción glandular (Sonkusare y cols, 2005; Kim y cols, 2010).

En términos generales podemos decir que los inhibidores de acetilcolinesterasa constituyen los principales medicamentos disponibles actualmente para el tratamiento de la EA que proporcionan una mejoría modesta y transitoria de la sintomatología así como mejoras cognitivas en un 5% de los pacientes (Doraiswamy y Xiong, 2006).



## 4.5 MODULADORES ALOSTÉRICOS DE LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS NEURONALES.

Un modulador alostérico es un coagonista que no activa el receptor al unirse a éste en un lugar distinto al de la acetilcolina. Sin embargo en el caso de un modulador alostérico positivo, esta unión produce una modificación conformacional que se traduce en una hipersensibilidad del receptor nicotínico neuronal por su ligando natural (ver sección 3.1) (Pepeu y Giovannini, 2009). Hipersensibilidad que se ve reflejada tanto a nivel presináptico, aumentando la secreción de ACh como postsináptico favoreciendo la transmisión colinérgica (Albuquerque y cols, 2009).

Varias moléculas han mostrado tener un efecto modulador alostérico positivo sobre el receptor nicotínico de ACh entre ellas: galantamina, fisostigmina, y codeína (Zouridakis y cols, 2009). La galantamina y la fisostigmina a su vez inhiben la acetilcolinesterasa (ver sección 4.4), sin embargo esta acción generalmente se produce a concentraciones mayores que la modulación alostérica.

Dentro de las principales ventajas de los moduladores alostéricos se pueden mencionar que a diferencia de los agonistas nicotínicos no desensibilizan el receptor (ver sección 4.3) y la baja generación de efectos adversos ya que la regulación alostérica no implica la activación directa del receptor solo potencia respuestas submáximas inducidas por el ligando endógeno (Zouridakis y cols, 2009).

## 4.6 ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EN EVALUACIÓN

Conocimientos crecientes de la biología molecular en la EA han delineado la generación de terapias capaces de modificar el curso de la patología (Town, 2010; Holtzman y cols, 2011); como los agentes antiamiloides que disminuyen la producción y acumulación del péptido  $\beta$  - amiloide, favorecen su eliminación y disminuyen su toxicidad; los agentes neuroprotectores que reducen el daño asociado a la producción del  $\beta$  - amiloide y los agentes que favorecen la neurorestauración (Cummings y cols, 2007; Karlhoski y cols, 2007; Panza y cols, 2009; De Strooper y cols, 2010).

#### 4.6.1 INHIBIDORES DE LA $\gamma$ – SECRETASA

Varios estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado que inhibidores de la  $\gamma$  – secretasa reducen la cantidad de  $\beta$  – amiloide (Siegel y cols, 2007; Ereshefsky y cols, 2009; Soares y cols, 2009). Sin embargo esta inhibición debe ser parcial y lo más selectiva posible ya que la  $\gamma$  – secretasa tiene una baja especificidad por los sustratos, una secuencia de corte no clara (Pollack y Lewis, 2005; Lleó, 2008) y ejerce su efecto sobre al menos 60 proteínas de membrana tipo I distintas entre ellas el receptor de Notch (Tomita, 2009; De Strooper y Annaert, 2010; Kounnas y cols, 2010).

El receptor de Notch es una proteína transmembrana que recibe señales extracelulares. La activación de Notch libera el fragmento intracelular de Notch (NICD) que se transloca al núcleo y regula la transcripción de genes involucrados en diferentes etapas del desarrollo celular como: proliferación, crecimiento, diferenciación y apoptosis (Radtke y cols, 2004 a, b; Tomita, 2009). Por lo que la inhibición de la  $\gamma$  – secretasa de forma no selectiva se ha asociado a defectos en la embriogénesis, desarrollo de atrofia en ciertos tejidos y alteraciones en el sistema inmune (Wong y cols, 2004; Hardy, 2006a; Li y cols, 2007; Lundkvist y Näslund, 2007).

Inhibidores clásicos de la  $\gamma$  – secretasa son péptidos miméticos que ejercen su efecto al interaccionar con el centro activo de la proteasa (Churcher y Beher, 2005). Un mayor conocimiento de la actividad  $\gamma$  – secretasa y de su sitio catalítico ha favorecido la búsqueda de inhibidores de la  $\gamma$  – secretasa con una mayor selectividad por el procesamiento de la APP. (Best y cols, 2007; Cole y cols, 2009; Martone y cols, 2009; Potter, 2010). Entre los que destacan: la inhibición de la  $\gamma$  – secretasa por medio de la interferencia con el sitio de anclaje a la APP (Wolfe, 2006; Wolfe, 2008), la inhibición de la proteína activadora de la  $\gamma$  – secretasa (GSAP) (He y cols, 2010) y la inhibición de subunidades específicas de la  $\gamma$  – secretasa (Serneels y cols, 2009).

Los moduladores de la  $\gamma$  – secretasa son moléculas que al interaccionar con la  $\gamma$  – secretasa o su sustrato disminuyen la producción del  $\beta$  – amiloide (Kukar y cols, 2008; Baumann y cols, 2009) sin llegar a inhibir la enzima ni el procesamiento de otros sustratos (Peretto y cols, 2005; Peretto y LaPorta, 2008). Ciertos AINEs pertenecen a este grupo los cuales mediante una vía ajena a la ciclooxigenasa modifican la actividad de la  $\gamma$  – secretasa (Lleó y cols, 2004; Leuchtenberger y cols, 2006; Sastre y Gentleman, 2010), provocando un desplazamiento en el sitio de corte de la APP lo que genera la liberación de un péptido amiloide

más corto (sobre todo  $A\beta_{38}$ ). Se cree que este desplazamiento en el lugar de corte es producido por un cambio conformacional en la  $\gamma$  – secretasa inducido por un mecanismo alostérico (Guardia-Laguarta, 2010).

A su vez estos compuestos vía ciclooxygenasa presentan beneficios al disminuir los procesos inflamatorios observados de forma habitual en los pacientes que sufren EA (ver sección 1.5). Estudios epidemiológicos sugieren una asociación entre el consumo crónico de ciertos AINEs y una reducción del riesgo de desarrollar EA (Cornelius y cols, 2004; McGeer y cols, 2006; Wyss-Coray, 2006; McGeer y McGeer, 2007; Zotova y cols, 2010).

#### 4.6.2 INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD $\beta$ – SECRETASA

La posibilidad de inhibir la BACE1 por medio de péptidos que asemejen estados de transición de las secuencias aminoacídicas del lugar de corte de la APP, es una estrategia llamativa en el tratamiento de la EA, ya que de esta forma se disminuye la producción, secreción, agregación y acumulación del péptido  $\beta$ -amiloide (ver figuras 1.3 y 1.4) (Citron, 2004; Majercak y cols, 2006; Baxter y cols, 2007; Lindsley y cols, 2007). La inhibición de la BACE1 surge como alternativa interesante ya que mejora la función cognitiva y además la enzima presenta una menor cantidad de sustratos en comparación con la  $\gamma$  – secretasa (Ohno y cols, 2006; Ma y cols, 2007; Ohno y cols, 2007; Ghosh y cols, 2008).

Sin embargo dos problemas principales surgen en la generación de inhibidores de la BACE1. Siendo el primero la aparición de alteraciones en animales *knock out* para BACE-1 como: muerte prematura (Domínguez y cols, 2005), problemas cognitivos (Laird y cols, 2005), problemas conductuales (Savonenko y cols, 2008), hipomielinización de nervios periféricos y alteraciones axonales de fibras aferentes que se traducen en déficits en actividades exploratorias, memoria y ubicación (Hu y cols, 2006; Willem y cols, 2006; Hu y cols, 2008).

El tamaño y complejidad del sitio catalítico de la BACE1 constituye el segundo problema, ya que dificulta el desarrollo de fármacos capaces de atravesar barrera hematoencefálica (Durham y Shepherd, 2006; Ghosh y cols, 2007; Siegel y cols, 2007).

Se analiza el desarrollo de nuevos inhibidores de la BACE1 más selectivos, capaces de atravesar barrera hematoencefálica y permanecer a nivel cerebral sin ser exportados por la glicoproteína p (ver sección 1.2.2).

Inclusive se estudia la posibilidad de generar inhibidores de la BACE1 capaces de acceder compartimientos intracelulares donde se localiza la enzima (Rajendran y cols, 2008; Silvestri, 2009; Sankaranarayanan y cols, 2009), así como la utilización de pequeños fragmentos de ARN interferente (siRNA) contra el gen BACE-1 con la finalidad de disminuir la expresión de la enzima (Kao y cols, 2004; Seabrook y cols, 2007).

#### 4.6.3 INHIBIDORES DE LA OLIGOMERIZACIÓN DEL $\beta$ -AMILOIDE

Determinadas moléculas conocidas como inhibidores PPI (*protein-protein interaction*) (Blazer y Neubig, 2009) por sus siglas en inglés son capaces de interactuar directamente con los monómeros de  $\beta$  - amiloide impidiendo su oligomerización y acumulación (Bagriantsev y Liebman, 2006; McLaurin y cols, 2006; Gervais y cols, 2007). Dentro de este grupo destacan serin proteasas dependientes de ATP (Kooistra y cols, 2009), ciertos antihipertensivos (Zhao y cols, 2009) y miméticos de glicosaminoglucanos (Rafii y Aisen, 2009; Citron, 2010).

De la misma manera la administración de quelantes, al disminuir la disponibilidad de iones metálicos que favorecen la oligomerización, mediante la formación de complejos modulan el ensamble de dímeros y trímeros del péptido  $\beta$  - amiloide (Lannfelt y cols, 2008).

#### 4.6.4 INHIBIDORES DE LA FOSFORILACIÓN Y AGREGACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU ( $\tau$ )

La existencia de una mayor correlación entre la cantidad de ovillos neurofibrilares y la progresión del deterioro cognitivo (McGowan y cols, 2006), concibe que estrategias donde se busca una disminución en la producción del péptido  $\beta$  - amiloide y/o un aclaramiento de placas seniles puedan retrasar inicio de la patología sin embargo plantean un beneficio modesto en pacientes donde la sintomatología ya está instaurada (Mazanetz y Fischer, 2007; Potter, 2010). Razón por la cual el desarrollo de inhibidores de la fosforilación, sustancias que impidan la agregación de la proteína  $\tau$  o que favorezcan la disolución de agregados existentes cobran interés (Dickey y cols, 2007; Pickhardt y cols, 2007; Matsuoka y cols, 2008; Schneider y Mandelkow, 2008).

Inhibidores de las Tau quinasas (Noble y cols, 2005; Le Corre y cols, 2006; Ávila y Hernández, 2007) o potenciadores de las fosfatasaes específicamente de la PP2A son los principales mecanismos para contrarrestar la hiperfosforilación en la EA (Gong y cols, 2006).

Actualmente se analizan otras alternativas como la eliminación de la proteína  $\tau$  mal plegada y/o sus agregados por medio de la activación de la autofagia mediada por chaperonas (Funderburk y cols, 2010), la utilización de litio capaz de inhibir la glicógeno sintasa quinasa  $3\beta$  y reducir su expresión a nivel de células del hipocampo y el uso de azul de metileno como inhibidor de la agregación de la  $\tau$  (Ballatore y cols, 2007; Schaffer y cols, 2008; Mendes y cols, 2009).

#### 4.6.5 INMUNIZACIÓN

La inmunización busca promover un aclaramiento del péptido  $\beta$  – amiloide. Los primeros estudios de inmunización se realizaron mediante la administración intramuscular del péptido  $\beta$  – amiloide<sub>1-42</sub>. Estudios que fueron detenidos debido al desarrollo de meningoencefalitis durante el periodo del estudio en algunos pacientes (Gilman y cols, 2005; Weiner y Frenkel, 2006).

Tras la comprobación de que la generación de anticuerpos anti - péptido  $\beta$  - amiloide favorece la reducción del  $\beta$  – amiloide por medio de la microglia y los macrófagos sanguíneos (Holmes y cols, 2008) y que la principal complicación observada en el estudio clínico se presentó por la activación de la inmunidad celular, se intensifica la búsqueda de inducir la inmunidad humoral sin activar las células T (Roberson y Mucke, 2006; Winblad y cols, 2009).

La inmunización pasiva mediante la administración de anticuerpos anti - péptido  $\beta$  - amiloide con el fin de evitar la respuesta celular surge como una opción sin embargo el desarrollo de microhemorragias cerebrales en ratones sometidos a este tratamiento (Lee y cols, 2006; Rinne y cols, 2010) sugiere la necesidad de nuevos acercamientos como: inmunización con el péptido  $\beta$  – amiloide<sub>1-15</sub>, acoplamiento del péptido amiloide a una proteína transportadora y administración nasal (Frenkel y cols, 2005; Salloway y cols, 2009; Schneeberger y cols, 2009).

#### 4.6.6 UTILIZACIÓN DE ESTATINAS

Estudios epidemiológicos muestran una menor incidencia de EA en pacientes tratados con estatinas (Fenili y McLaurin, 2005; Sabbagh y cols, 2009; Sparks y cols, 2010) y aunque la utilidad de estos fármacos en pacientes con EA no muestra beneficios importantes (Feldman y cols, 2010; McGuinness y cols, 2010) se ha incentivado la investigación al respecto.

Estudios *in vitro* demuestran que las estatinas modulan el metabolismo de la APP favoreciendo una disminución en la producción de  $\beta$  – amiloide, debido a que el procesamiento de la APP ocurre en regiones de la membrana denominadas balsas lipídicas (*lipid rafts*) (Ehehalt y cols, 2003; Morgan y cols, 2007; Kosicek y cols, 2010). Estos microdominios de membrana enriquecidos en colesterol, esfingolípidos, fosfolípidos saturados y proteínas que compartimentalizan los procesos celulares (Roychaudhuri y cols, 2009) presentan menor fluidez, alta susceptibilidad al estrés oxidativo y favorecen la vía amiloidogénica. Las estatinas aumentan la fluidez de la membrana, favorecen una disminución del colesterol en la misma y disminuyen la cantidad y distribución de la APP en las balsas lipídicas (Guardia-Laguarta y cols, 2009; Pollen y cols, 2010).

El desarrollo de esta vía como posible intervención preventiva en la EA requiere analizar, evaluar y modificar la capacidad de las estatinas de penetrar la barrera hematoencefálica ya que casi la totalidad del colesterol cerebral se sintetiza *in situ* (Rushworth y Hooper; 2011).

## 4.7 OTROS ACERCAMIENTOS PREVENTIVOS, TERAPÉUTICOS Y POSIBLES APLICACIONES A FUTURO

A nivel experimental el uso de inhibidores de los RAGEs (ver sección 1.2.1) ha demostrado una disminución en la acumulación y toxicidad cerebral del péptido  $\beta$  – amiloide (Rafii y Aisen, 2009).

Favorecer el procesamiento de la APP por medio de enzimas con actividad  $\alpha$ -secretasa ya sea potencializando su efecto o aumentando su expresión es un abordaje terapéutico atractivo (Bandyopadhyay y cols, 2007; Hiraoka y cols, 2007), sin embargo estimular el efecto de una enzima presenta mayores dificultades que su inhibición. Más aún en este caso donde la actividad  $\alpha$  – secretasa es llevada a cabo por varias enzimas donde se requeriría conocer precisamente la identidad y contribución de cada una de ellas. Por lo que la mayoría de esfuerzos a este nivel se ha realizado indirectamente mediante la estimulación del receptor muscarínico M1 de acetilcolina, el uso de agonistas nicotínicos  $\alpha 7$ , agonistas serotoninérgicos 5HT4 y moduladores del receptor GABA<sub>A</sub> (Hardy, 2006c; Citron, 2010). Es importante considerar que las consecuencias de la estimulación crónica esta vía no se conocen (De Strooper y cols, 2010).

La utilización de correctores estructurales constituidos por moléculas pequeñas capaces de unirse a la estructura de la APOE  $\epsilon 4$  e inhibir la interacción intramolecular de los dominios

(ver sección 1.1.2), favorece la adquisición de una conformación estructural similar a la APOE  $\epsilon 3$  (Ye y cols, 2005; Mahley y cols, 2006). Aspecto que puede disminuir el daño neurodegenerativo y el mayor deterioro cognitivo asociados a la expresión de la APOE  $\epsilon 4$  (Hatters y cols, 2006; Bu, 2009).

La activación de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas gamma (PPAR $\gamma$ ) genera efectos antiamiloides, antiinflamatorios y sensibiliza la respuesta a la insulina (Risner y cols, 2006; Heneka y Landreth, 2007). Por lo que se ha investigado como posible abordaje terapéutico de la EA sin resultados positivos (Harrington y cols, 2009; Sakurai, 2011).

Estudios preclínicos asocian los inhibidores de la fosfodiesterasa con efectos neuroprotectores y antiinflamatorios por lo que su uso puede ser beneficioso en la prevención de la EA (Ghavami y cols, 2006; Puzzo y cols, 2009).

La estimulación de receptores de somatostatina a nivel cerebral induce la expresión y modula la actividad de las principales enzimas encargadas de la degradación proteolítica del péptido amiloide a nivel cerebral (ver sección 1.2.2) aspecto que podría ser beneficioso en el tratamiento y/o prevención de la EA (Saito y cols, 2005; Ciaccio y cols, 2009).

Antagonistas del receptor de serotonina 5HT $_6$  pueden aumentar de forma variable la neurotransmisión colinérgica, glutamatérgica, noradrenérgica, y dopaminérgica favoreciendo el aprendizaje y la memoria (Upton y cols, 2008).

Un aumento en la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 a nivel cerebral puede ser beneficioso en la prevención y/o tratamiento de la EA ya que ésta se ha asociado a procesos de neuroprotección (Karlinski y cols, 2007).

## **2. OBJETIVOS**



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto del péptido  $\beta$  - amiloide (25 - 35) y sus mecanismos de acción en neuronas piramidales pertenecientes a la región CA3 del hipocampo de rata por medio de técnicas electrofisiológicas de registro intracelular.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar electrofisiológicamente las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo de rata mediante la aplicación de estímulos intracelulares.

Determinar el efecto del péptido  $\beta$  - amiloide (25-35) sobre la resistencia de la membrana de las células piramidales de la región CA3 del hipocampo tras bloquear los receptores muscarínicos con antagonistas selectivos y no selectivos.

Describir el efecto del péptido  $\beta$  - amiloide (25-35) sobre la resistencia de la membrana de las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo tras activar los receptores muscarínicos con distintos agonistas.

Identificar el efecto del péptido  $\beta$  - amiloide (25-35) sobre la resistencia de la membrana de las células piramidales de la región CA3 del hipocampo tras inhibir selectivamente la proteína quinasa C.

Analizar el efecto del péptido  $\beta$  - amiloide (25-35) sobre la resistencia de la membrana de las células piramidales de la región CA3 del hipocampo tras bloquear el receptor intracelular de inositol trifosfato (IP3).

Precisar el efecto del péptido  $\beta$  - amiloide (25-35) sobre la resistencia de entrada de las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo después de utilizar distintos bloqueantes de los canales de potasio dependientes de voltaje tipo KCNQ.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

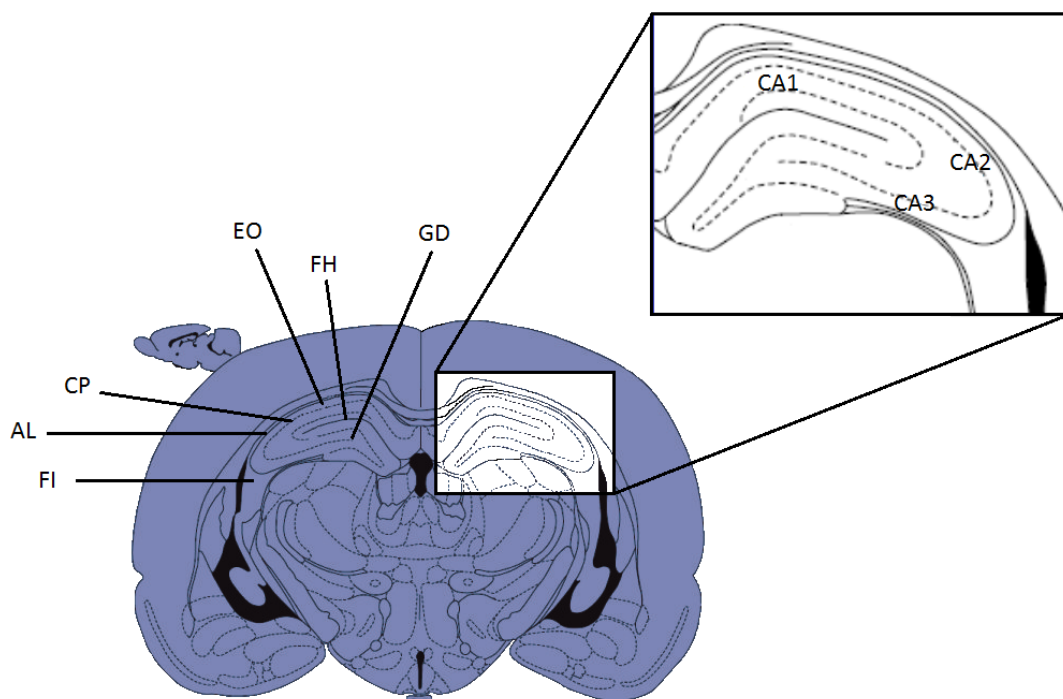
Tanto la caracterización electrofisiológica como el estudio farmacológico de la presente investigación se llevaron a cabo en neuronas de la región CA3 del hipocampo de la rata. Para lo cual se utilizaron rodajas cerebrales de ratas Wistar, machos o hembras en período postnatal (de P22 a P45) con pesos comprendidos entre 30 y 50 gramos. Todos los animales se obtuvieron de la colonia animal disponible en la Universidad de Salamanca.

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices españolas (BOE 67/8509-12, 1988) y la regulación de la Unión Europea (86/609/UE) para el uso de animales de laboratorio.

### **3.2. ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO**

#### **3.2.1. AISLAMIENTO DEL ENCÉFALO**

Los animales fueron anestesiados profundamente con equitesina (0,2ml/50g IP), para minimizar su sufrimiento y luego decapitados. La piel de la cabeza se diseccionó para exponer el cráneo retirándose rápidamente los huesos frontal, parietal y occipital así como las meninges. Durante todo el procedimiento el tejido nervioso se mantuvo constantemente húmedo y frío (entre 2° C y 4° C) mediante la aplicación, con una pipeta de Pasteur, de solución de Krebs modificada (ver Tabla 3.1.) burbujeada con gas carbógeno (95% O<sub>2</sub>; 5% CO<sub>2</sub>). Tras seccionar los pares craneales, se extrajo todo el encéfalo y se sumergió en solución de Krebs modificada, burbujeada con gas carbógeno y mantenida entre 2° C y 4° C. Posteriormente, se procede a eliminar cualquier resto de meninges, vasos sanguíneos y al tallado de la pieza, para lo que se situó el encéfalo sobre una placa fría y se eliminó la parte anterior del cerebro mediante un corte coronal limpio a nivel del quiasma óptico. Seguidamente mediante una disección coronal cuidadosa se elimina la parte posterior del cerebro y el cerebelo con sus pedúnculos, dejando la sección de interés (ver figura 3.1).



**Figura 3. 1. Tallado de la pieza donde se observa un corte coronal de cerebro a nivel de hipocampo, a partir del cual se obtienen las rodajas.** La región encerrada en rectángulo corresponde al hipocampo. CA1: región CA1 del hipocampo, CA2: región CA2 del hipocampo, CA3: región CA3 del hipocampo, GD: giro dentado, FH: fisura del hipocampo, EO: estrato oriens, CP: capa de células piramidales, AL: alveus, FI: fimbria. Fuente: Adaptado Paxinos y Watson, 2004.

### 3.2.2 OBTENCIÓN DE LAS RODAJAS

Para la obtención de las rodajas coronales, todos los cortes se realizaron adhiriendo la porción posterior de la pieza cerebral tallada con cianoacrilato, a un bloque de aluminio, quedando la porción frontal de la misma hacia la cuchilla. La sección a cortar se protegió completamente con bloques de agar (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) al 4% (p/v) de unos 4 mm aproximadamente; con el fin de que durante el corte no se desplazara el tejido nervioso. Las rodajas de entre 350 a 400  $\mu\text{m}$ , se obtuvieron utilizando un vibratomo (serie VT 1000 S, Leica, Inc., EE.UU.) (ver figura 3.2 ). Posteriormente, las rodajas que quedaron flotando en la solución de Krebs modificada, se recogieron con ayuda de un pincel fino y un gotero de boca ancha y se dispusieron en una cámara de incubación. Generalmente, de cada hemisferio cerebral se obtuvieron entre 3 y 5 rodajas que contenían la sección CA3 del hipocampo.



Figura 3.2. Vibratomo Leica VT 1000 S empleado para obtener las rodajas de hipocampo.

### 3.2.3 INCUBACIÓN DE LAS RODAJAS

Para la incubación de las rodajas se utilizó un baño de mantenimiento de rodajas con el sistema de interface Ringer - aire propuesto por Nicoll y Alger (1981) (ver figura 3.3). En nuestro caso, el sistema estuvo compuesto por una cámara de plástico en cuyo interior se colocaron tres soportes de metacrilato sobre los que se apoyó una malla del mismo material. Además, en uno de los extremos de la parte inferior de la cámara se colocó un difusor de gas por el que se burbujeó continuamente gas carbógeno. La cámara se llenó con agua destilada hasta conseguir que la malla de metacrilato sobresaliera aproximadamente 2 cm sobre la superficie del líquido y que el difusor quedase sumergido. Las rodajas se colocaron sobre mallas de metacrilato dentro de placas de Petri que contenían solución de Krebs y se cubrieron con papel de filtro, el cual estuvo en contacto con la solución para evitar la generación de burbujas entre el papel y la solución. La cámara se cerró con una tapa que contaba con un pequeño orificio en el extremo opuesto al difusor de gas. Esto garantizó una atmósfera saturada de oxígeno y de vapor de agua dentro de la cámara.

Las rodajas se incubaron a temperatura ambiente durante un tiempo nunca inferior a una hora ni superior a siete horas. En todos los casos, el tiempo total transcurrido desde el sacrificio de la rata hasta la colocación de las rodajas en la cámara de incubación fue de aproximadamente 5 minutos.

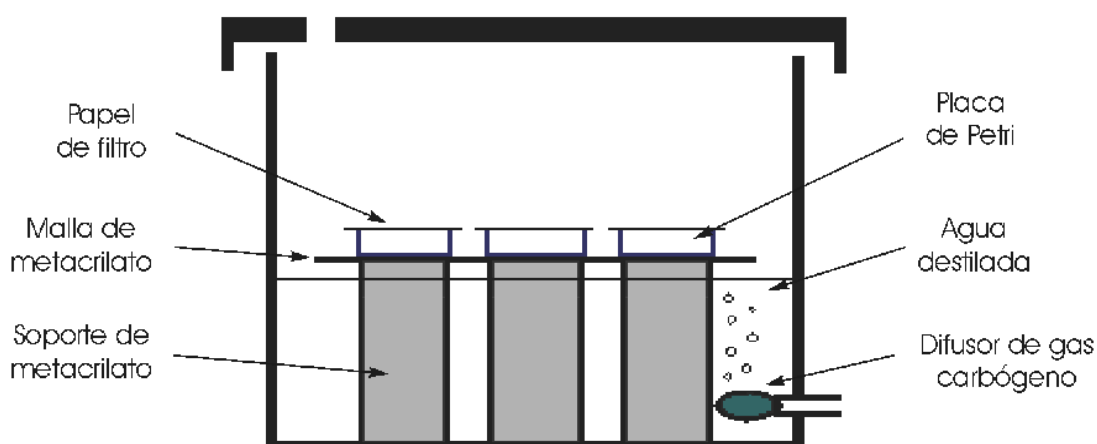


Figura 3.3. Esquema de cámara de incubación utilizado para incubación de las rodajas de hipocampo.

### 3.2.4 CÁMARA DE REGISTRO Y SOLUCIONES EMPLEADAS

Tras el período de incubación, cada rodaja se colocó en una cámara de registro del tipo interfase de gas (modelo BSC-HT, Warner Instruments Harvard Apparatus Inc., MA, EE.UU.) (ver figura 3.4), la cual proporciona un intercambio rápido de fluidos y garantiza estabilidad suficiente para el registro intracelular. En este tipo de cámara, las rodajas descansan sobre una malla elástica de nylon, alrededor de la cual fluye, por acción capilar, una delgada capa de solución Krebs. Mediante un flujo de gas carbógeno, las rodajas se oxigenaron y humidificaron a lo largo de su superficie superior. La solución de Krebs que baña los cortes se mantuvo en circulación a temperatura ambiente durante los registros.



**Figura 3.4.** Cámara de registro de la actividad neuronal BSC-HT. Fuente: [http://www.warneronline.com/product\\_info.cfm?ID=980](http://www.warneronline.com/product_info.cfm?ID=980); 2011.

En los procedimientos experimentales se emplearon dos tipos de soluciones de Krebs (ver tabla 3.1.). Desde la decapitación del animal hasta la obtención de las rodajas se utilizó una solución de Krebs modificada. Para la incubación y durante todo el proceso de registro se utilizó solución de Krebs normal. La solución de Krebs modificada poseen una menor concentración de ión sodio y su finalidad es minimizar la entrada del mismo al interior celular y por tanto, la despolarización de las neuronas, sobre todo durante la obtención de los cortes. Por otra parte, la sustitución de NaCl por sacarosa a una concentración de 234 mM tiene como objetivo conservar la osmolaridad total de la solución.

En todo momento, las soluciones se burbujearon con gas carbógeno con el fin de mantener adecuados el aporte de oxígeno y el pH de las mismas ( $\text{pH} \approx 7,2$ ). Todos los productos utilizados en la elaboración de las soluciones fueron de la marca comercial Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.)

La solución de Krebs normal se introdujo en la cámara de registro mediante una bomba de perfusión peristáltica (modelo 2115 Multiperpex Pump LKB Bromma, Amphotech LTD, MA, EE.UU.). El flujo se ajustó a razón de 1,5 - 2 ml/min.

Tabla 3.1 Composición de las soluciones de Krebs empleadas en la obtención e incubación de las rodajas.

Composición (mmol/L)	Krebs Normal (mM) pH= 7,1 - 7,3	Krebs Modificado (mM) pH= 7,1 - 7,3
NaCl	117,00	
KCl	4,70	4,70
CaCl <sub>2</sub>	2,50	2,50
MgCl <sub>2</sub>	1,20	1,20
NaHPO <sub>4</sub>	1,25	1,25
Glucosa	11,00	11,00
NaHCO <sub>3</sub>	25,00	25,00
Sacarosa		234,00

### 3.3. REGISTRO DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA NEURONAL

#### 3.3.1 ELECTRODOS DE REGISTRO

Para el registro intracelular se emplearon micropipetas de vidrio (borosilicato) rellenas con una solución de acetato potásico 3 M. Para la fabricación de las micropipetas se usaron tubos capilares de vidrio con un diámetro externo de 1 mm y un diámetro interno de 0,58 mm, con filamento interno (World Precision Instruments INC., Sarasota, FL. EE.UU.). Los tubos capilares se estiraron mediante un estirador de pipetas (modelo P87, Sutter Instrument Company, Novato, CA, EE.UU.) (ver figura 3.5). Las pipetas obtenidas tuvieron una resistencia final de 150-230 MΩ, aproximadamente.



Figura 3.5 Estirador de pipetas Sutter Instrument Company P87 utilizado en la fabricación de los electrodos de registro. Fuente: [http://www.sutter.com/products/large\\_productimages/p87.jpg](http://www.sutter.com/products/large_productimages/p87.jpg); 2011.



Los microelectrodos se conectaron, mediante un hilo de plata clorada, a un acoplador de impedancias ("*headstage*") (modelo HS180, Bio-Logic-Science Instrument S.A., Francia), con una resistencia de entrada mayor de  $1 \times 10^{11} \Omega$  y una capacidad máxima de inyección de corriente de 100 nA. La señal registrada se amplificó 10 veces con un amplificador de registros intracelulares (modelo VF180, Bio-Logic-Science Instrument S.A., Francia) (ver figura 3.6). Para la visualización directa de los registros se utilizó un osciloscopio (modelo 5110, Tektronix, Beaverton, OR, EE.UU.). Los registros se realizaron en la modalidad de fijación de corriente ("*current-clamp*").



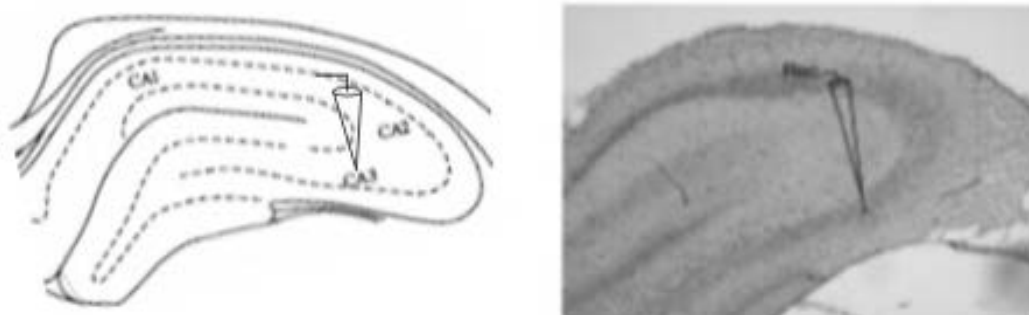
**Figura 3.6** Amplificador de registros intracelulares utilizado Bio Logic modelo VF180. Fuente: <http://www.bio-logic.info/electrophysiology/vf180.html>, 2011

### 3.3.2 DISPOSICIÓN DE ELECTRODOS

El electrodo de registro se situó en la rodaja específicamente en la región CA3 del hipocampo con la ayuda de un microscopio (Axioskop, Zeiss, Inc., EE.UU.) (ver figura 3.7) y de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson, 2004 (ver figura 3.8). Para la colocación y posterior desplazamiento de los electrodos, se emplearon micromanipuladores manuales (modelo Canberra, Narishige, Tokio, Japón).



**Figura 3.7.** Microscopio Axioskop utilizado para la localización electrodos, Zeiss, Inc., EE.UU. Fuente: <http://www.zeiss.com>; 2011.



**Figura 3.8. Localización del electrodo de registro en una rodaja coronal de hipocampo.** Fuente: Adaptado Paxinos y Watson, 2004.

Una vez situado el electrodo de registro sobre el sitio seleccionado, se fue desplazando en dirección al tejido. Simultáneamente y a través de este mismo electrodo, se inyectó un pulso de corriente despolarizante de 0,1 nA de intensidad, 30 ms de duración y una frecuencia de 1 Hz. Este pulso se generó con un estimulador modelo MASTER-8 de A.M.P. Instruments LTD (ver figura 3.9), el cual estaba conectado a una unidad aisladora modelo ISU 165 de la compañía Cibertec.



**Figura 3.9. Generador de pulsos programable Master-8 utilizado.** Fuente: <http://www.ampi.co.il/master8cp.html>; 2011

Cuando se observó un aumento en la amplitud del pulso a través del electrodo de registro, indicativo de un aumento de la resistencia de punta del electrodo, se aplicó a través del amplificador una corriente oscilatoria de alta frecuencia, lo que facilitó, si se estaba cerca de una neurona, la penetración del electrodo en la misma. Este hecho se comprobó al observar en el osciloscopio valores de potencial compatibles con valores de potencial de membrana y por la generación de potenciales de acción con el pulso despolarizante. En este momento, se invirtió rápidamente la polaridad del pulso, alargando su duración a 300 ms y disminuyendo su

frecuencia a 0,2 Hz; y de ser necesario se procede a la administración de corriente directa hiperpolarizante. Una vez que cesan las descargas y bajo estas condiciones la célula generalmente se hiperpolariza lo que hace necesario ajustar la corriente suministrada para mantener el valor control del potencial de membrana. Posteriormente y antes de iniciar el protocolo de experimentación, se permite que la neurona en cuestión se estabilice alcanzando el valor de potencial de membrana en reposo.

### **3.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTALES DE REGISTRO INTRACELULAR**

#### **3.4.1 CARACTERIZACIÓN NEURONAL**

Una vez estabilizada la neurona a un valor de potencial de membrana cercano a los -70 mV se inyectaron pulsos cuadrados de corriente de 300 ms de duración, 0,2 Hz de frecuencia y de intensidad variable desde -0,4 nA hasta valores ligeramente mayores a la reobase. Con la finalidad de determinar las propiedades de la membrana en reposo (Spruston y McBain, 2007), establecer la dependencia de voltaje a distintos valores de corriente, generar potenciales de acción y analizar distintos parámetros electrofisiológicos.

##### **3.4.1.1 PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS DE LAS NEURONAS DE LA REGIÓN CA3 DEL HIPOCAMPO**

En los registros neuronales obtenidos se valoraron parámetros electrofisiológicos que se dividieron en dos grupos: las propiedades de la membrana en reposo donde se evaluó principalmente el potencial de membrana y la resistencia de entrada; y las propiedades activas de la misma.

El potencial de membrana en reposo se determinó como la diferencia de potencial registrado a través de la membrana cuando la célula está en reposo fisiológico. Mientras que la resistencia de entrada neuronal se estableció mediante la aplicación de un pulso de corriente hiperpolarizante de amplitud constante (1nA) que provoca una variación del potencial de membrana cuya amplitud (voltaje en mV) fue determinada. Conocida la corriente inyectada y la variación de voltaje que provoca, el cálculo de la resistencia de la membrana se realizó aplicando la ley de Ohm ya que el cambio de voltaje observado en el estado estacionario está determinado

por la resistencia de entrada de forma que considera aspectos como la resistencia de la membrana y su geometría (Gu y cols, 2005; Spruston y McBain, 2007).

Con el fin de identificar electrofisiológicamente el tipo neuronal registrado y proceder a la clasificación de la neurona registrada, se analizaron las propiedades activas de la membrana, donde destaca el análisis del potencial de acción y la presencia de actividad espontánea.

Los principales parámetros analizados del potencial de acción fueron (ver figura 3.10):

Reobase: se considera como la menor intensidad de corriente de duración establecida (300 ms) necesaria para que se produzca un potencial de acción (Dégenétais y cols, 2002).

Potencial umbral: se consideró como valor umbral el valor de potencial de membrana en el que se detectó un cambio significativo en la pendiente de despolarización.

Amplitud: se midió como la diferencia de voltaje entre el punto positivo máximo y el valor umbral del mismo potencial de acción.

Duración del potencial: se consideró el tiempo transcurrido desde que se alcanzó el valor umbral para producir el potencial de acción hasta que se volvió a alcanzar el mismo valor durante la fase de repolarización.

Duración media de la espiga: se definió como el intervalo de tiempo comprendido entre el punto en que la espiga alcanzó el 50% de su amplitud en la fase de despolarización, y el punto en el que su amplitud presentó el mismo valor en la fase de repolarización.

Tiempo de despolarización: tiempo comprendido entre el 10% y el 90% de la amplitud, medida desde el valor umbral hasta el pico máximo del potencial de acción.

Tiempo de repolarización: es el tiempo comprendido entre el 90% y el 37% de la amplitud medida desde el pico máximo del potencial de acción hasta el valor umbral.

Posthiperpolarización: las neuronas piramidales presentan una posthiperpolarización (AHP) en fases inmediatamente posterior a la fase de repolarización del potencial de acción, formada por una posthiperpolarización rápida (fAHP) y una posthiperpolarización más lenta (mAHP y sAHP)

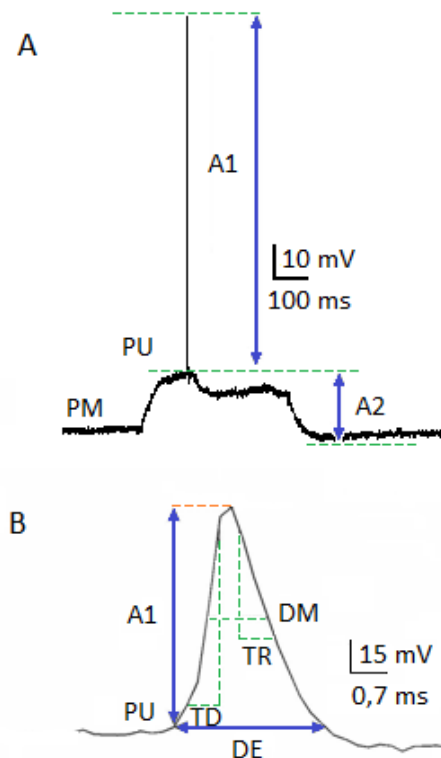
separadas por una fase de postdespolarización (ADP) (Faber y Sah, 2002). Esta medición hace referencia al valor de la magnitud y duración de la fAHP.

Postdespolarización: esta medición hace referencia al valor de la magnitud y duración de la ADP.

Latencia: es el tiempo transcurrido desde la aplicación del estímulo externo hasta que se observa inicio del potencial de acción.

Actividad espontánea: está se manifiesta mediante la presencia de potenciales de acción una vez que la neurona alcanza el valor de potencial de reposo en ausencia de un estímulo despolarizante externo y antes de la adición de bloqueantes de la transmisión sináptica.

Sólo se incluyeron en el estudio aquellas neuronas que presentaron potenciales de reposo iguales o mayores a  $-60$  mV y que tras ser estimuladas con pulsos cuadrados de corriente despolarizante generaron potenciales de acción, con amplitudes de espiga igual o mayor a  $70$  mV (ver figura 3.10) .



**Figura 3.10. Propiedades activas de la membrana: A** Registro de potencial de acción de una neurona de la región CA3 del hipocampo. PM: potencial de membrana, PU: potencial umbral, A1: amplitud del potencial de acción medida desde el potencial umbral hasta el pico máximo, A2: amplitud para la determinación de la posthiperpolarización. **B. Registro del potencial de acción de la misma neurona extendido en el tiempo.** TD: tiempo de despolarización desde el 10 al 90% de la amplitud, TR: tiempo de repolarización desde el 90 al 37% de la amplitud, DE: duración del potencial de acción y DM: duración media del potencial de acción. Figura B: modificado de Navarro, 2004.

### **3.4.2 PROTOCOLO FARMACOLÓGICO**

Después de caracterizar electrofisiológicamente la neurona registrada se estudió el efecto del péptido  $\beta$  - amiloide (25-35) sobre las propiedades electrofisiológicas de la neurona registrada de la región CA3 del hipocampo en rata, específicamente sobre los valores de la resistencia basal. Concretamente se analizan los valores del potencial de membrana alcanzado al inyectar un pulso hiperpolarizante de corriente y los valores de la resistencia de entrada neuronal; en presencia de distintas sustancias que actúan a nivel de receptores o canales, específicamente en el receptor muscarínico M1 ó en algún punto de su vía de señalización (ver figura 1.22). Considerando el sitio de acción o mecanismo mediante el cual cada fármaco estudiado ejerce su actividad se realizó la clasificación en los distintos protocolos analizados.

#### **3.4.2.1 PROTOCOLO ELECTROFISIOLÓGICO**

Una vez estabilizada la neurona y establecido el valor del potencial de membrana en reposo se procede a determinar la intensidad, duración y frecuencia de los pulsos de corriente hiperpolarizante que se aplican. En el presente estudio se fijó la magnitud de la corriente hiperpolarizante inyectada en un valor cercano a los -0,1 nA, intensidad que genera un aumento en el potencial de membrana entre 10 y 15 mV con respecto al valor del potencial de membrana en reposo. La duración de los pulsos aplicados fue de entre 300 y 500 ms y la frecuencia en todos los casos fue de 0,2 Hz.

La intensidad de corriente seleccionada se mantuvo constante a lo largo de toda la fase del experimento. En caso de que se detectase variaciones del potencial de membrana en reposo este se ajusto mediante la inyección de corriente constante para corregir la desviación.

Para determinar el efecto de los diferentes fármacos perfundidos (según el protocolo seleccionado) sobre los valores de la resistencia basal y minimizar el posible efecto de activación de aferentes sobre la misma se añadieron al medio de perfusión distintas drogas como TTX, AP5, CNQX y M - caconitina a las concentraciones establecidas (ver sección 3.4.2.1.1 y protocolos específicos) según el protocolo a seguir.

Todas las sustancias utilizadas se incorporan al sistema al disolverse en un volumen determinado de solución de Krebs normal (proporcionando la concentración deseada) que bañan la rodaja al introducirse en la cámara de registro mediante una bomba de perfusión peristáltica (ver sección 3.2.4). Cada sustancia añadida se mantiene durante un periodo no menor a

15 minutos. Periodo en el cual no se suma ningún otro fármaco; con el fin de asegurar que la respuesta observada es debida a la presencia de la sustancia de interés en el medio.

Con los registros obtenidos de variación del potencial de membrana a lo largo del tiempo, y considerando que la intensidad de la corriente se mantuvo constante a lo largo del proceso de experimentación es posible determinar la variación temporal de la resistencia de entrada para la célula en estudio y así analizar como se ve afectada ésta con la adicción de distintos fármacos.

### **3.4.2.2 FÁRMACOS UTILIZADOS**

En este estudio se utilizaron los siguientes fármacos:

Ácido -2-amino-5-fosfonopentanoico (AP5 ó APV) (Sigma; St. Louis, MO, EE.UU.): El APV es un antagonista específico de los receptores de glutamato de tipo NMDA (Lewis y Faber, 1996). Se utilizó a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  (Fernández de Sevilla y cols, 2002; Hemond y cols, 2008).

Sulfato de atropina (Sigma; St. Louis, MO, EE.UU.): la atropina es un antagonista competitivo inespecífico de receptores colinérgicos de tipo muscarínico. Se aplicó a concentraciones entre los 0,3  $\mu\text{M}$  y los 1,5  $\mu\text{M}$  (Faber y Sah, 2002).

Cloruro de bario (Sigma; St. Louis, MO, EE.UU.): como se mencionó anteriormente el bario a nivel extracelular es la sustancia comúnmente utilizada para producir una inhibición dosis dependiente de la  $I_M$  (Brown y Selyanko, 1985; Selyanko y cols, 1999). En la presente investigación se utiliza a una concentración de 3mM (Romero y cols, 2004).

Carbacol (Research Biochemicals Inc.; Natick, MA., EE.UU.): El carbacol es un agonista no selectivo de los receptores colinérgicos (Yajeya y cols, 2000; Fernández de Sevilla y cols, 2002). En este trabajo se aplicó a una concentración de 15  $\mu\text{M}$ .

Chelerytrine (Tocris, Biogen Científica S.L., España): la chelerytrine se comporta como un potente inhibidor selectivo de la proteína quinasa C permeable a la membrana citoplasmática. Se estima que a concentraciones cercanas a los 0,7 $\mu\text{M}$  es capaz de bloquear la mitad de la actividad máxima de la quinasa. En el presente estudio se utilizó en concentraciones entre los 5 y 10  $\mu\text{M}$  (Herbert y cols, 1990; Korotkova y cols, 2002).

6-Ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX) (Sigma; St. Louis, MO, EE.UU.): El CNQX es un potente antagonista competitivo de los receptores de glutamato de tipo AMPA/Kainato (No NMDA) (Watkins *y cols*, 1990). Este fármaco se utilizó a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  (Devor y Yarom, 2002; Bordey y Southheimer, 2003; Hu *y cols*, 2007; Hemond *y cols*, 2008).

Linopiridina (Tocris, Biogen Científica S.L., España): también conocido como DuP 996, es un bloqueante de los canales de potasio dependientes de voltaje tipo KCNQ, menos potente que el XE991. En estudios *in vitro* se utiliza en concentraciones que oscilan entre los 3 y 100  $\mu\text{M}$ . Específicamente en estudios con neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo la concentración para bloquear el 50% de la corriente  $I_M$  oscila entre los 2,4 y 8,5  $\mu\text{M}$  (Schnee y Brown, 1998; Wang *y cols*, 1998). La linopiridina a concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  posee un efecto ligero sobre el bloqueo de canales KCNQ a valores cercanos al potencial de membrana (Fisahn *y cols*, 2002; Romero *y cols*, 2004). En el presente estudio se ha utilizado a concentraciones entre 15 y 20  $\mu\text{M}$ , con el fin de asegurar un bloqueo de la  $I_M$  en neuronas hipocampales cercano al 90 % y no producir afectaciones considerables a otras corrientes (Yue y Yaari, 2004).

McN-A-343 (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) Este fármaco es un agonista selectivo de los receptores colinérgicos de tipo muscarínico M1 (Micheletti y Schiavone, 1990; Calabresi *y cols*, 1998; Shen *y cols*, 1999). En este estudio el McN-A-343 se usó a una concentración de 130  $\mu\text{M}$ .

Metillicaconitina (M-caconitina) (Research Biochemicals Inc., Natick, MA, EE.UU.): la M-caconitina es un potente bloqueante de los receptores colinérgicos nicotínicos neurales. Este fármaco se usó a una concentración de 0,1  $\mu\text{M}$  (Marchi *y cols*, 2002).

Pirenzepina (Tocris, Biogen Científica S.L., España): La pirenzepina es un antagonista competitivo de los receptores muscarínicos M1 (Hammer *y cols*, 1980), cuya especificidad queda determinada por la elevada constante de afinidad y la concentración utilizada (Klink y Alonso, 1997a,b; Yajeya *y cols*, 1999).

Tetrodotoxina (TTX) (Sigma; St. Louis, MO, EE.UU.): La TTX es un bloqueante reversible altamente selectivo de los canales de sodio, su efecto a nivel neuronal incapacita la producción de potenciales de acción (Narahashi, 1972; Elliott y Elliott, 1993). Este fármaco se utilizó a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  (Yajeya *y cols*, 1997; Hemond *y cols*, 2008).



XE991 (Tocris, Biogen Científica S.L., España): El XE991 es un bloqueador diez veces más potente de los canales KCNQ que la linopiridina (Wang *y cols*, 1998; Wang *y cols*, 2000, Romero *y cols*, 2004). Estudios *in vitro* señalan su utilización en concentraciones que oscilan entre los 1  $\mu$ M y los 20  $\mu$ M. A concentraciones de 10  $\mu$ M se considera un bloqueo casi total de los canales KCNQ (Elmedy *y cols*, 2007, Leão *y cols*, 2009). En el presente estudio experimental se utiliza a una concentración de 6  $\mu$ M con el fin de obtener un bloqueo de la  $I_M$  cercano al 90% (Yue y Yaari, 2004). A concentraciones mayores a los 40  $\mu$ M el XE991 produce una inhibición inespecífica de la  $I_M$  ya que también inhibe de forma reversible otros canales (Leão *y cols*, 2009).

2-Aminoetoxi-difenilborato (2-APB) (Tocris, Biogen Científica S.L., España): El 2-APB es una molécula permeable a la membrana que a bajas concentraciones actúa como un agonista competitivo del receptor de inositol trifosfato. Mientras que concentraciones mayores se comporta como un antagonista de dicho receptor (Maruyama *y cols*, 1997; Togashi *y cols*, 2008). Como antagonista se utiliza a concentraciones mayores de 100  $\mu$ M (Bai *y cols*, 2006).

### **3.4.2.3 UTILIZACIÓN DE ANTAGONISTAS MUSCARÍNICOS NO SELECTIVOS**

Como se mencionó anteriormente, la unión del neurotransmisor o en su defecto un agonista ó antagonista, a nivel los receptores muscarínicos de acetilcolina en el sistema nervioso central, tiene su efecto sobre un canal iónico de forma indirecta. Con el fin de determinar si la presencia de un antagonista no selectivo de los receptores muscarínicos en el medio afecta el efecto del péptido  $\beta$  - amiloide <sup>(25-35)</sup> sobre los valores de la resistencia de entrada en reposo, de las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo, se utilizó atropina a concentraciones entre los 0,3  $\mu$ M y los 1,5  $\mu$ M (Faber y Sah, 2002; Núñez *y cols*, 2002), previo a la perfusión con  $\beta$  - amiloide monomérico.

#### **3.4.2.4 UTILIZACIÓN DE ANTAGONISTAS MUSCARÍNICOS DEL SUBTIPO M1 SELECTIVOS**

Basándonos en el enunciado anterior y utilizando un procedimiento similar se utilizó pirenzepina a concentraciones de 0,075  $\mu\text{M}$  hasta 2.35  $\mu\text{M}$  (McCormick y Prince 1986) como antagonista selectivo de los receptores subtipo M1.

#### **3.4.2.5 APLICACIÓN DE AGONISTAS MUSCARÍNICOS**

Es bien conocido que los agonistas del receptor muscarínico subtipo M1 a nivel de sistema nervioso central modifican los valores de la resistencia basal aumentando la misma (Gu y cols, 2005). Nosotros hemos utilizado agonistas muscarínicos en el medio para activar dichos receptores y analizar posteriormente el efecto péptido  $\beta$  - amiloide (25-35). Los agonistas muscarínicos utilizados fueron: muscarina a concentraciones entre 10  $\mu\text{M}$  y 30 $\mu\text{M}$ , carbacol a una concentración de 15  $\mu\text{M}$  y McN-A-343 a una concentración de 130  $\mu\text{M}$ .

#### **3.4.2.6 UTILIZACIÓN DE INHIBIDORES DE LA PROTEÍNA QUINASA C**

A nivel de fisiología neuronal la familia de las proteína quinasas presentan funciones importantes como la modificación de la corriente M, ya que se encuentran asociadas a la vía de señalización del fosfatidilinositol. En el presente trabajo de experimentación se analizó el efecto de chelerythrine como inhibidor de la PKC, a concentraciones entre los 5  $\mu\text{M}$  y 10 $\mu\text{M}$ ; sobre la resistencia de entrada de neuronas de la región CA3 de hipocampo y como la presencia del mismo modifica el efecto del péptido  $\beta$  - amiloide (25-35).

#### **3.4.2.7 EMPLEO DE ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR INTRACELULAR DE INOSITOL TRIFOSFATO (IP3)**

La liberación intracelular de calcio está mediada por el IP3, puesto que el calcio puede modular la corriente M, en el presente estudio se determinó el efecto del 2-APB; como antagonista permeable a la membrana del receptor de inositol trifosfato a una concentración de

100  $\mu$ M; sobre la resistencia de entrada neuronal en reposo de las células hipocámpales registradas ubicadas en la región CA3 de hipocampo. A su vez se analiza si la presencia del 2-APB en el medio modifica el efecto que posee péptido  $\beta$  - amiloide (25-35) sobre la conductancia basal de las neuronas piramidales.

### **3.4.2.8 UTILIZACIÓN BLOQUEANTES DEL CANAL DE POTASIO TIPO KCNQ**

El efecto a nivel de la resistencia de entrada de las neuronas derivado del uso de reguladores directos del canal de potasio posee gran importancia a nivel del sistema nervioso, ya que su control modifica la excitabilidad celular. Un bloqueo de los canales KCNQ produce un aumento en la resistencia de entrada de las células. Como inhibidores de la  $I_M$  se utilizó linopiridina a concentraciones entre los 15 y 20  $\mu$ M, XE991 a una concentración de 6  $\mu$ M y bario extracelular a concentraciones de 3mM. Con cada uno de los bloqueantes señalados, después de un tiempo nunca inferior a 15 minutos de perfusión, se estudió el efecto péptido  $\beta$  - amiloide (25-35) en presencia de un bloqueante del canal de potasio.

## **3.5 ADQUISICIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LOS DATOS**

Los datos se transfirieron y almacenaron en un ordenador Pentium III de 450 MHz usando una interfase convertidora analógica-digital (modelo CED 1401 plus, CED, Cambridge, Reino Unido). Para la adquisición de los datos se utilizó el programa comercial Spike 2 Capture (versión 3.14 para Windows, Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, Reino Unido). Estos datos se analizaron posteriormente mediante el programa de análisis Spike2 Data Analysis, (versión 4.11 para Windows, Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, Reino Unido), o se transformaron en archivos binarios para su análisis mediante el programa Mini Analysis Program (versión 5.1.6, Synaptosoft Inc., Decatur, GA, EE.UU.).

## **3.6 ANÁLISIS DE LOS DATOS**

En los registros obtenidos se observa el efecto de un pulso hiperpolarizante de corriente sobre el potencial de membrana de la célula registrada. Ya que el pulso administrado es de

magnitud conocida y constante a lo largo de la experimentación; se obtiene y representa la variación de la resistencia de entrada de la célula con respecto al tiempo. Los valores de la resistencia de entrada obtenidos se agrupan en tres periodos (S0, S1, S2) de acuerdo a la presencia o ausencia en el medio de la sustancia o sustancias estudiadas. Se denomina S0 como el conjunto de valores de resistencia de entrada obtenidos tras la estabilización de la neurona y anteriores a la adicción de alguna de las sustancias incluidas en el estudio farmacológico (periodo control). El periodo S1, comprende los valores de la resistencia de entrada obtenidos después de la perfusión con la primera sustancia de interés incluida en el protocolo farmacológico. El periodo S2, se denomina al conjunto de valores de resistencia de entrada que se obtienen en presencia del  $\beta$  – amiloide (25-35).

Para posibilitar la comparación entre los distintos tratamientos farmacológicos se determina la resistencia de entrada relativa de cada neurona en dos periodos consecutivos. El primero en presencia del fármaco en estudio (S1) (perteneciente a alguno de los protocolos de estudio) y posteriormente en presencia del péptido  $\beta$  – amiloide (S2). Para el cálculo de la resistencia de entrada relativa se toma como referencia (dividendo) los valores de la resistencia de entrada anteriores a la situación en estudio.

### 3.7 ESTADÍSTICA DE LOS DATOS

Para el análisis estadístico se utilizaron dos programas: el programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 19.0 para Windows (IBM Corporation., Somers, N.Y., EE.UU.); y Sigma Stat versión 3.5 para Windows (Systat Software Inc, Chicago, IL., EE.UU.). Este último se utilizó en el caso de requerir la realización de pruebas no paramétricas. En todos los casos a no ser que se indique lo contrario los datos obtenidos se expresan como el valor de la media  $\pm$  el error estándar y se consideran diferencias estadísticamente significativas las encontradas a un nivel de significación del 95% ( $p < 0,05$ ).

La comparación de medias de las principales propiedades electrofisiológicas según patrón de disparo encontradas en los registros de neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo de rata se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA). De la misma manera se procedió con el análisis de los valores de resistencia de entrada relativa en el periodo S2 según el protocolo farmacológico aplicado. La verificación de normalidad de la variable cuantitativa en los grupos se realizó mediante la aplicación de la prueba Kolmogorov-Smirnov ó

de la prueba Shapiro-Wilk. Mientras que la homogeneidad de las varianzas poblacionales se demostró por medio de la prueba de Levene. Una vez obtenidos estos datos se procede a la realización de la prueba de análisis de la varianza por medio del programa SPSS. Si el valor de  $p$  obtenido indica rechazo de la hipótesis nula o es cercano al nivel de significación estadística se utilizó la prueba de Bonferroni; con el fin de comparar las medias en los múltiples pares de grupos que pueden contrastarse e intentar determinar en qué grupo o grupos se encuentra la diferencia que ha causado el rechazo de la hipótesis nula en la primera parte del ANOVA.

En el caso de obtenerse desviaciones en la normalidad de los valores en algunos de los grupos de estudio se procedió a la realización del contraste de hipótesis mediante el uso de pruebas no paramétricas específicamente mediante el test de Kruskal-Wallis.

La comparación de medias de los valores de la resistencia de entrada según el protocolo farmacológico aplicado se realizó para cada una de las distintas neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo de rata registradas utilizando para ello la prueba  $t$  de Student entre dos grupos de datos (S0 y S1 o S1 y S2) (ver sección anterior). Para la realización de esta prueba se asumió normalidad al analizar muestras grandes ( $n \geq 50$ ); de lo contrario se realizó una comprobación de la misma mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. En todos los casos, previa a la realización de la prueba  $t$  se realizó la prueba de Levene de homogeneidad de varianzas a fin de determinar la fórmula a utilizar en el contraste de medias.

### **3.8 REPRESENTACIÓN GRÁFICA**

La representación gráfica de los datos se realizó mediante los programas comerciales Mini Analysis Program, Spike2 Data Analysis versión para Windows (Cambridge Electronic Design Ltd, Cambridge, Reino Unido) y Sigma Plot versión 11.0 para Windows (Systat Software Inc, Chicago, IL., EE.UU.). Los gráficos y/o registros de estos programas, se exportaron como meta-archivos mejorados y se representan con el programa CorelDRAW Graphics Suite X5 versión 15.0 para Windows (Corel Corporation, Ottawa, Canadá), Paint versión 6.1 para Windows 7 (Microsoft Corporation, Way Redmond, WA., EE.UU.) y/o BatchPhoto Pro versión 2.6 para Windows (Bits&Coffee SRL, Craiova, Rumania).

## **4. RESULTADOS**

## ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO *IN VITRO* EN RODAJAS DE LAS NEURONAS PIRAMIDALES DE LA REGIÓN CA3 DEL HIPOCAMPO DE LA RATA

Estos estudios se llevaron a cabo mediante la técnica de registro intracelular en la modalidad de fijación de corriente (*current – clamp*) en rodajas de la región CA3 del hipocampo.

### 4.1 ESTUDIO DE CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA

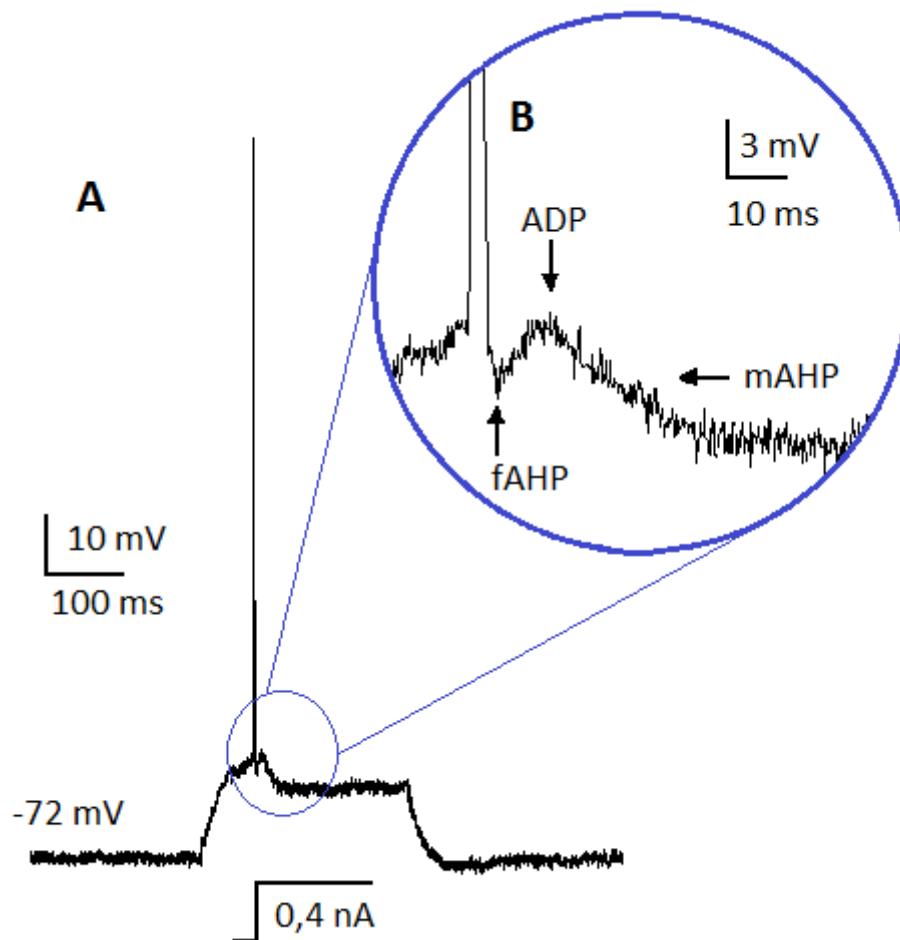
#### 4.1.1 TIPOS CELULARES IDENTIFICADOS EN LA REGIÓN CA3 DEL HIPOCAMPO DE LA RATA

Antes de comenzar a estudiar las neuronas de la región CA3 del hipocampo, se realizó una caracterización electrofisiológica de las mismas. Para llevar a cabo el estudio electrofisiológico *in vitro* se utilizaron rodajas de hipocampo de ratas. La ubicación del lugar de registro se realizó con ayuda de un microscopio acoplado al sistema de registro (más detalle ver sección 3 *Materiales y Métodos*).

Se registraron intracelularmente 64 neuronas localizadas en la región CA3 del hipocampo, de las cuales 9 se clasifican como neuronas de tipo no piramidal. Su activación directa por inyección intracelular de corriente despolarizante generó, al igual que en las de tipo piramidal, potenciales de acción o trenes de potenciales de acción, dependiendo de la intensidad y duración de la corriente aplicada; éstos potenciales presentan: posthiperpolarizaciones de gran magnitud ( $> 15$  mV) y duración ( $> 6$  ms), resistencia de entrada elevada ( $> 300$  M $\Omega$ ) y carencia de postdespolarización (Freund y Buzsáki, 1996; Chitwood y Jaffe, 1998; Chitwood y cols, 1999), estas características las diferencian de las neuronas piramidales. Las observaciones más frecuentes en este tipo de células fueron la presencia de una posthiperpolarización monofásica después del potencial de acción y carencia de adaptación.

La posthiperpolarización con tres fases es propia de las neuronas de tipo piramidal y está constituida por una posthiperpolarización rápida (fAHP), una postdespolarización (DAP) y una fase de posthiperpolarización posterior (AHP) compuesta por: una posthiperpolarización media (mAHP) y una posthiperpolarización caudal lenta (sAHP) (Faber y Sah, 2002; Spruston y McBain, 2007) (ver figura 4.1).

Atendiendo a estas características, se encontraron dos grupos neuronales diferentes que se clasificaron como neuronas piramidales y no piramidales. Salvo que se especifique lo contrario, todos los resultados de los estudios *in vitro* llevados a cabo en este trabajo pertenecen a neuronas clasificadas como piramidales.



**Figura 4.1 Caracterización electrofisiológica del potencial de acción de una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo.** A. Potencial de acción provocado por la inyección de corriente despolarizante de intensidad 0,4 nA y 300 ms de duración. B. Detalle de la fase de postdespolarización (ADP) que divide el curso de la posthiperpolarización (AHP) del potencial de acción mostrado en A. La identificación de la fase de ADP se utilizó para clasificar las neuronas como piramidales (Lacaille y Williams, 1990; Alvarado, 2001). fAHP: fase de posthiperpolarización rápida, mAHP: fase media de la posthiperpolarización



#### 4.1.2 CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE LAS NEURONAS PIRAMIDALES DE LA REGIÓN CA3 DEL HIPOCAMPO DE LA RATA

En el presente estudio las 55 neuronas denominadas piramidales; se clasificaron en tres grupos de acuerdo a las características de sus patrones de disparo y a descripciones previas realizadas por varios autores (López-García y King, 1994; Dégenétais y cols 2002; Prescott y DeKoninck, 2002; Rivera, 2006; Hemond y cols, 2008). Los patrones de disparo fueron obtenidos al aplicar pulsos de corriente despolarizante de intensidad igual o ligeramente mayor a la reobase y de 300 ms de duración. De esta manera las neuronas piramidales se catalogan como: de espiga única (n=28), fásicas (n=24) ó tónicas (n=3) (ver figura 4.2).

Las neuronas piramidales que presentaban un patrón de disparo de espiga única solo presentan uno o dos potenciales de acción al ser despolarizadas (ver figura 4.3). Estas neuronas presentan un valor de potencial de membrana en reposo de  $-71,0 \pm 5,3$  mV, una resistencia de entrada de  $162,4 \pm 4,3$  M $\Omega$  y en el 85,7 % de los casos al finalizar el estímulo despolarizante se presenta una hiperpolarización de amplitud variable cuyo valor promedio es de  $5,16 \pm 2,04$  mV.

La intensidad más baja de corriente despolarizante necesaria para que se produzca el potencial de acción fue de  $0,185 \pm 0,068$  nA, y en el 85,7% de los casos la aparición del potencial de acción se da en el primer tercio de la duración del estímulo. El potencial umbral para este tipo de células fue de  $-55,2 \pm 4,8$  mV. Las amplitudes de espiga del potencial de acción se encuentran entre los 71,3 y los 109,8 mV, con una duración de  $4,39 \pm 1,50$  ms, un tiempo de despolarización de  $0,55 \pm 0,14$  ms, un tiempo de repolarización de  $1,26 \pm 0,53$  ms y una duración media del potencial de acción de  $1,74 \pm 0,65$  ms (ver tabla 4.1 y figura 3.10 en *Materiales y Métodos*).

En el presente estudio las neuronas que presentaban un patrón de disparo de espiga única, mostraron una posthiperpolarización (AHP) bifásica formada por una posthiperpolarización rápida (fAHP) inmediatamente después de la repolarización, con un pico de amplitud de  $3,92 \pm 1,86$  mV cuya duración oscilaba entre los 2 y 5ms, y una posthiperpolarización más lenta (mAHP) de amplitud y duración variable (entre los 1,6 y 25,0 mV; los 40 y 90 ms). Las dos fases anteriores estuvieron separadas por una fase de postdespolarización (ADP) con una amplitud de  $4,35 \pm 1,19$  mV y duración entre los 9 y 42 ms.

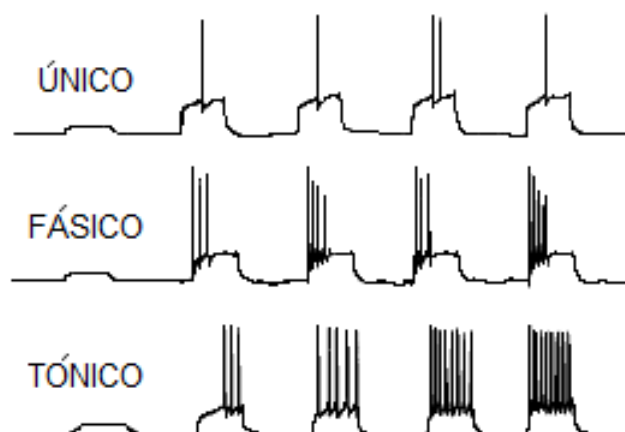


Figura 4.2 Esquema general de los patrones de disparo encontrados en las neuronas piramidales registradas.

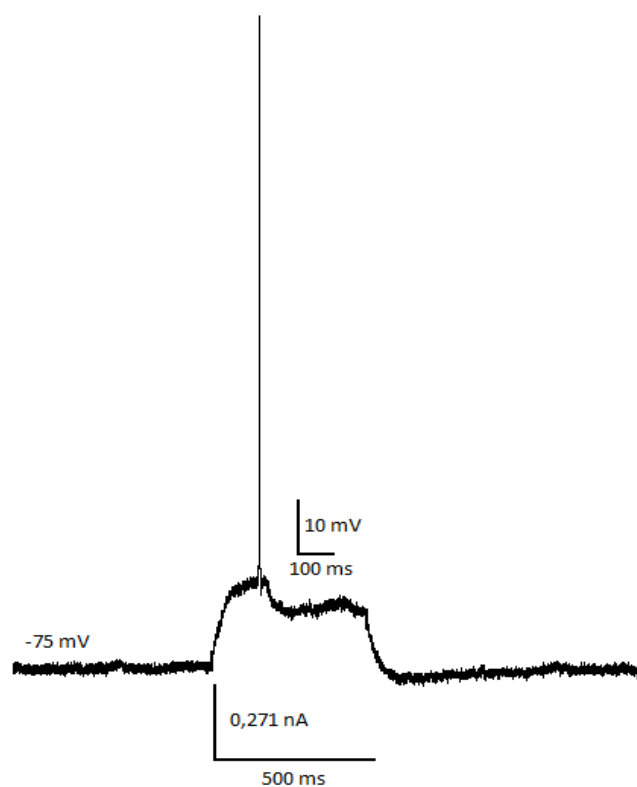


Figura 4.3 Patrón de disparo de espiga única de una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo. Potencial de acción provocado por la inyección de corriente despolarizante de intensidad 0,271 nA y 500 ms de duración.

## Resultados

Tabla 4.1. Principales propiedades electrofisiológicas de las neuronas piramidales registradas en la región CA3 del hipocampo de rata según patrón de disparo.

Propiedades Electrofisiológicas	Tipo de neurona según patrón de disparo			Análisis Estadístico
	Única	Fásica	Tónica	
Pot Memb rep (mV)	-71,0 ± 5,3	-72,5 ± 3,9	-72,9 ± 0,8	p > 0,05
Resist Entrada (MΩ)	162,4 ± 4,3	162,2 ± 2,9	160,8 ± 3,3	p > 0,05 <sup>3</sup>
Reobase (nA)	0,185 ± 0,068	0,173 ± 0,060	0,124 ± 0,033	p > 0,05
Pot Umbral (mV)	-55,2 ± 4,8	-53,8 ± 5,6	-55,4 ± 5,3	p > 0,05
Ampl descarga (mV) <sup>1</sup>	71,3 - 109,8	74,6 - 133,1	72,6 - 101,4	p > 0,05
Durac potencial (ms)	4,39 ± 1,50	3,67 ± 0,94	3,74 ± 0,35	p > 0,05
Durac media pot (ms)	1,94 ± 0,65	1,85 ± 0,85	1,67 ± 0,34	p > 0,05 <sup>3</sup>
T despolarizac (ms)	0,55 ± 0,14	0,46 ± 0,18	0,57 ± 0,20	p > 0,05 <sup>3</sup>
T repolarizac (ms)	1,26 ± 0,53	1,18 ± 0,44	0,96 ± 0,12	p > 0,05 <sup>3</sup>
Hiperpol postestímulo	5,16 ± 2,04	5,90 ± 2,14	4,16 ± 0,11	p > 0,05
Latencia (ms) <sup>1</sup>	2,1 - +200 <sup>2</sup>	8,4 - +200 <sup>2</sup>	5,0 - +200 <sup>2</sup>	—
fAHP (mV)	3,92 ± 1,86	3,50 ± 1,54	3,49 ± 0,16	p > 0,05
DAP (mV)	4,35 ± 1,19	4,04 ± 1,39	3,32 ± 1,22	p > 0,05
mAHP (mV) <sup>1</sup>	1,6 - 9,5	2,5 - 10,2	1,4 - 2,5	p < 0,05**

Datos expresados como media ± desviación estándar

<sup>1</sup> Datos expresados como valores máximo y mínimo

<sup>2</sup> Valores de latencia mayores a los 200 ms

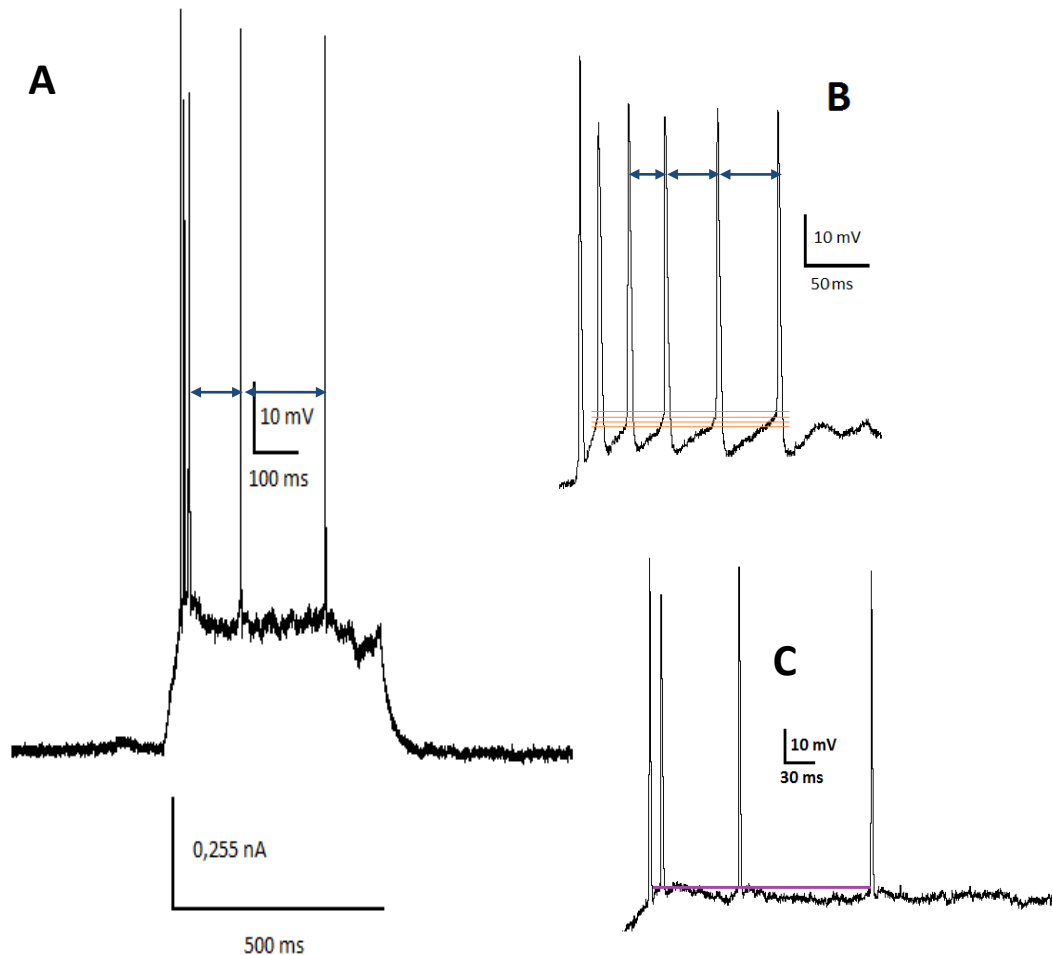
El contraste de hipótesis de las propiedades electrofisiológicas según el patrón de disparo observado, se realiza mediante un análisis de varianza (ANOVA) previo verificación de la distribución normal de la variable cuantitativa y la homogeneidad de varianzas. Comprobación de la normalidad se realizó por medio de la prueba Kolmogorov-Smirnov ó Shapiro-Wilk; mientras que la homogeneidad de varianzas se verifica por medio de la prueba de Levene. Si valor de p lleva al rechazo de la hipótesis nula ( $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 \dots = \mu_n$ ) o es cercano al nivel de significancia \*\*, se realiza la prueba de Dunn-Bonferroni; con el fin de realizar comparaciones de las medias en las múltiples parejas de grupos que puedan contrastarse y así intentar averiguar dónde está la diferencia (o diferencias) que ha causado el rechazo de la hipótesis nula en la primera parte del ANOVA. De existir incumplimiento en la normalidad de los valores en algunos de los grupos de estudio <sup>3</sup> se procede a la realización del contraste de hipótesis mediante el uso de pruebas no paramétricas específicamente mediante el test de Kruskal-Wallis (contraste de medianas). Así si valor de p lleva al rechazo de la hipótesis nula ( $H_0: k$  muestras independientes proceden de la misma población o de poblaciones idénticas con la misma mediana) se realiza la prueba de Dunn-Bonferroni; con el fin de realizar comparaciones entre medianas en las múltiples parejas de grupos que puedan contrastarse para determinar dónde está la diferencia (o diferencias) que ha causado el rechazo de la hipótesis nula en la primera parte del análisis.

f AHP: posthiperpolarización rápida, DAP: postdespolarización, m AHP: posthiperpolarización media

## Resultados

Las neuronas fásicas generan potenciales de acción en trenes, constituidos por dos o más descargas. Este tipo neuronal a su vez presenta potenciales de acción cuya frecuencia va disminuyendo a lo largo del tiempo que dura el estímulo (*spike frequency adaptation (SFA)*), produciéndose una obvia adaptación característica de las neuronas piramidales del hipocampo (McCormick, 2004; Wittner y cols., 2007).

Ejemplo de este proceso adaptativo es que solo en el 12,5% de los casos las descargas se mantienen por un tiempo mayor a la mitad de la duración del estímulo. También se observa que el tiempo entre cada descarga dentro de un mismo tren aumenta, así como el potencial umbral entre descargas del mismo tren. Mientras que el potencial umbral de distintos trenes o descargas individuales se mantiene relativamente constante (ver figura 4.4).



**Figura 4.4 Patrón de disparo en fases de una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo.** A. Potencial de acción provocado por la inyección de corriente despolarizante de intensidad 0,255 nA y 500 ms de duración. Donde se señala con flechas el aumento de tiempo entre descargas B. Detalle de un tren de disparos de una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo, donde se señala con flechas el aumento de tiempo entre descargas del mismo tren y con líneas continuas se señala el aumento del potencial umbral de cada descarga del tren. C. Detalle de disparo fásico de neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo donde la línea continua señala potencial umbral de descargas individuales.

## Resultados

---

De las neuronas que presentan un patrón de disparo en brotes o fases, el 75,0% presentan una única descarga en forma de tren constituida principalmente por tripletes ó cuartetos. En el 16,7% de los casos se observan dos regiones o zonas de descargas definidas, constituidas ya sea por un tren inicial y una descarga única posterior ó por dos descargas únicas; ambos patrones encontrados en igual proporción. Y sólo en el 8,3% de los casos se presentan más de dos regiones definidas de descarga, constituidas generalmente por un tren inicial y descargas únicas posteriores.

Las neuronas fásicas presentaron un potencial de membrana en reposo de  $-72,5 \pm 3,9$  mV, una resistencia de entrada de la membrana de  $162,4 \pm 3,2$  M $\Omega$  y en un 75,0 % de los casos al finalizar el estímulo despolarizante se presenta una hiperpolarización que como en el caso de las neuronas que presentan un patrón de disparo de espiga única es de amplitud variable ( $5,90 \pm 2,14$  mV).

El valor de la reobase para este tipo neuronal fue de  $0,173 \pm 0,060$  nA. El 37,5% de los casos se considera que poseen respuestas tardías ya que la aparición del potencial de acción se genera después del primer tercio de la duración del estímulo. El potencial umbral para las neuronas que presentaron un patrón de disparo en fases fue de  $-53,8 \pm 5,6$  mV.

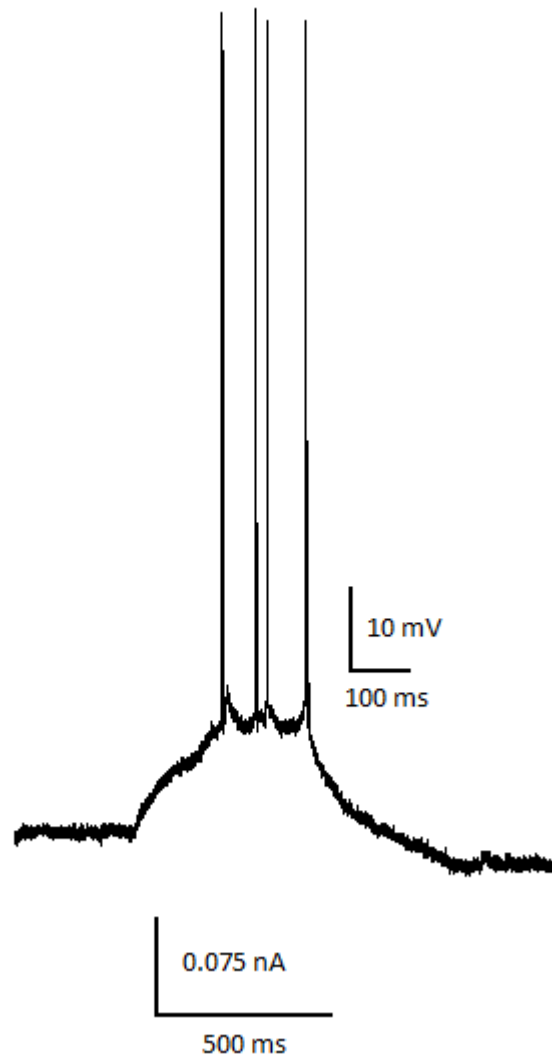
Los potenciales de acción de las neuronas fásicas presentaron: espigas con amplitudes que oscilaban entre los 74,6 y los 133,1 mV, duraciones de  $3,67 \pm 0,94$  ms, tiempos de despolarización de  $0,46 \pm 0,18$  ms, tiempos de repolarización de  $1,18 \pm 0,44$  ms y duraciones medias de  $1,85 \pm 0,85$  ms (ver tabla 4.1 y figura 3.10 en *Materiales y Métodos*).

En este tipo de neuronas la posthiperpolarización rápida (fAHP) presenta una amplitud de  $3,50 \pm 1,54$  mV cuya duración oscilaba entre los 1,5 y 4,5ms, y una posthiperpolarización más lenta (mAHP) de amplitud variable entre los 2,5 y los 10,2 mV y duración también variable (entre 50 y 100 ms). La fase de postdespolarización (ADP) presentó una amplitud de  $4,04 \pm 1,39$  mV y una duración entre los 10 y 42 ms.

En el presente estudio las neuronas denominadas tónicas se caracterizan porque una vez alcanzado el potencial umbral responden con una descarga sostenida de potenciales de acción. Estos potenciales una vez iniciados ocupan la totalidad del tiempo del estímulo aplicado; sin presentar adaptabilidad (SFA). No se observan patrones de disparo definidos ni variaciones aparentes en los valores umbrales de las descargas (ver figura 4.5).

## Resultados

Este tipo de neuronas presentaron un valor de potencial de membrana en reposo de  $-72,9 \pm 0,8$  mV, una resistencia de entrada de la membrana de  $160,8 \pm 3,3$  M $\Omega$  y en la totalidad de los casos al finalizar el estímulo despolarizante se presenta una hiperpolarización de  $4,16 \pm 0,11$  mV. El valor de la reobase fue de  $0,124 \pm 0,033$  nA y el valor del potencial umbral de  $-55,4 \pm 5,3$  mV. El potencial de acción presentó espigas cuyas amplitudes oscilaban entre los 72,6 y los 90,6 mV, con una duración de  $3,74 \pm 0,35$  ms, un tiempo de despolarización de  $0,57 \pm 0,20$  ms, un tiempo de repolarización de  $0,96 \pm 0,12$  ms y una duración media del potencial de acción de  $1,67 \pm 0,34$  ms (ver tabla 4.1 y figura 3.10 en *Materiales y Métodos*).

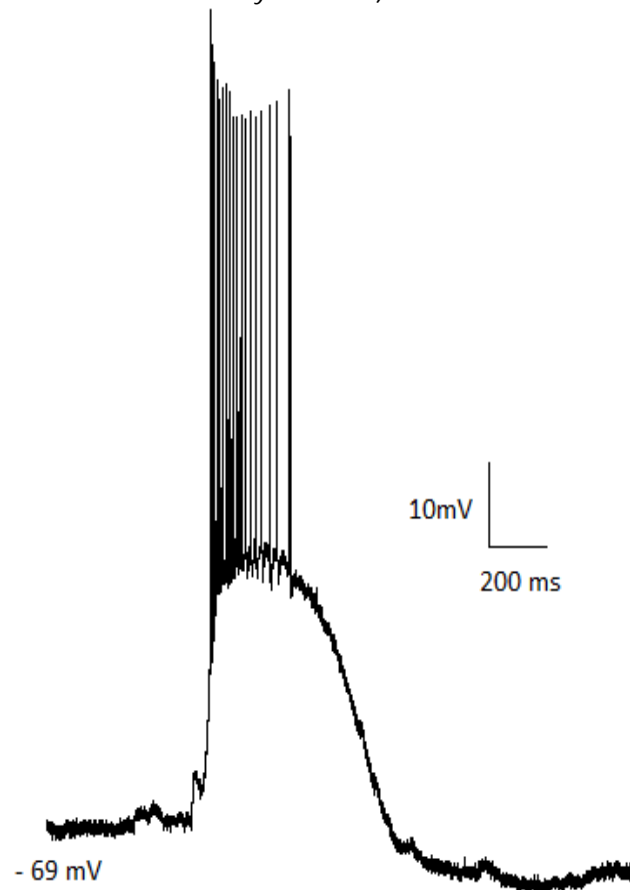


**Figura 4.5 Patrón de disparo tónico de una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo.**  
Potencial de acción provocado por la inyección de corriente despolarizante de intensidad 0,075 nA y 500 ms de duración.

## Resultados

En este tipo de neuronas la posthiperpolarización rápida (fAHP) presenta una amplitud de  $3,46 \pm 0,16$  mV y una duración de  $2,5 \pm 0,5$  ms; mientras que la posthiperpolarización más lenta (mAHP) es de  $1,74 \pm 0,37$  mV y duración variable (entre 30 y 60 ms). Las células con patrón de disparo tónico poseen una fase de postdespolarización (ADP) cuya amplitud es de  $3,32 \pm 1,22$  mV y duración entre los 10 y 19 ms.

En el presente estudio de la totalidad de las 55 neuronas caracterizadas como piramidales el 43,6% presentó potenciales de acción espontáneos a valores cercanos al potencial de reposo y en el 29,1% de las mismas, dichas respuestas espontáneas se presentaron en forma de ráfaga (ver figura 4.6). Como se mencionó anteriormente estas determinaciones se realizaron mediante observación directa de potenciales de acción una vez que la neurona alcanza el valor de potencial de reposo, en ausencia de un estímulo despolarizante externo y antes de la adición de drogas bloqueantes de la transmisión sináptica (más detalle ver sección 3.4.1 *Materiales y Métodos*).



**Figura 4.6 Potencial de acción espontáneo en forma de ráfaga o "burst" de una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo.** En la figura se evidencia una descarga en ráfaga en ausencia de una inyección de corriente despolarizante. Este tipo de descargas son frecuentes en neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo y presentan tal como se observa un período de tiempo generalmente corto con una elevada frecuencia de disparos seguido por un segundo período de inactividad. El primer período se compone de varios potenciales de acción sobre una onda despolarizante (Spruston y McBain, 2007).

### 4.1.3 CURVAS CORRIENTE - VOLTAJE

Con el objetivo de determinar el efecto de la inyección intracelular de corriente sobre la resistencia de la membrana de las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo, se inyectaron pulsos cuadrados de corriente de 300 ms de duración y de intensidades que oscilaban desde  $-0,4$  nA hasta valores cercanos a la intensidad de corriente necesaria para que se produzca un potencial de acción (ver figura 4.7 - A); con los datos obtenidos se construyeron curvas corriente - voltaje.

En todos los casos dichas curvas muestran una relación lineal entre ambas variables para los valores explorados (ver figura 4.7 - B). Aunque conforme la intensidad de la corriente aplicada disminuye y se acerca a  $-0,3$  nA existen rectificaciones aparentes en los valores fisiológicos de voltaje. En la figura 4.8 se puede observar esta situación, donde se presenta un ligero alejamiento del comportamiento lineal en las curvas de corriente contra voltaje al desplazarse hacia la izquierda en el eje de las abscisas. También es evidente un desplazamiento del comportamiento lineal consonante con el acercamiento de la magnitud del pulso de corriente despolarizante al valor de la reobase, posiblemente debido a la apertura de canales de sodio voltaje dependientes.

Bajo las condiciones del estudio y a pesar de las variaciones en los patrones de disparo no se observan diferencias en las curvas de corriente-voltaje según el patrón de disparo. También se puede notar que la inyección de pulsos cuadrados de corriente hiperpolarizante de mayor intensidad, no generan en ningún caso, potenciales de acción una vez finalizado el pulso de corriente (rebote). En todas las células analizadas, después de la aplicación del pulso hiperpolarizante de mayor intensidad el potencial de membrana de la misma vuelve a valores cercanos a los valores de reposo (ver figura 4.7 - A).



## Resultados

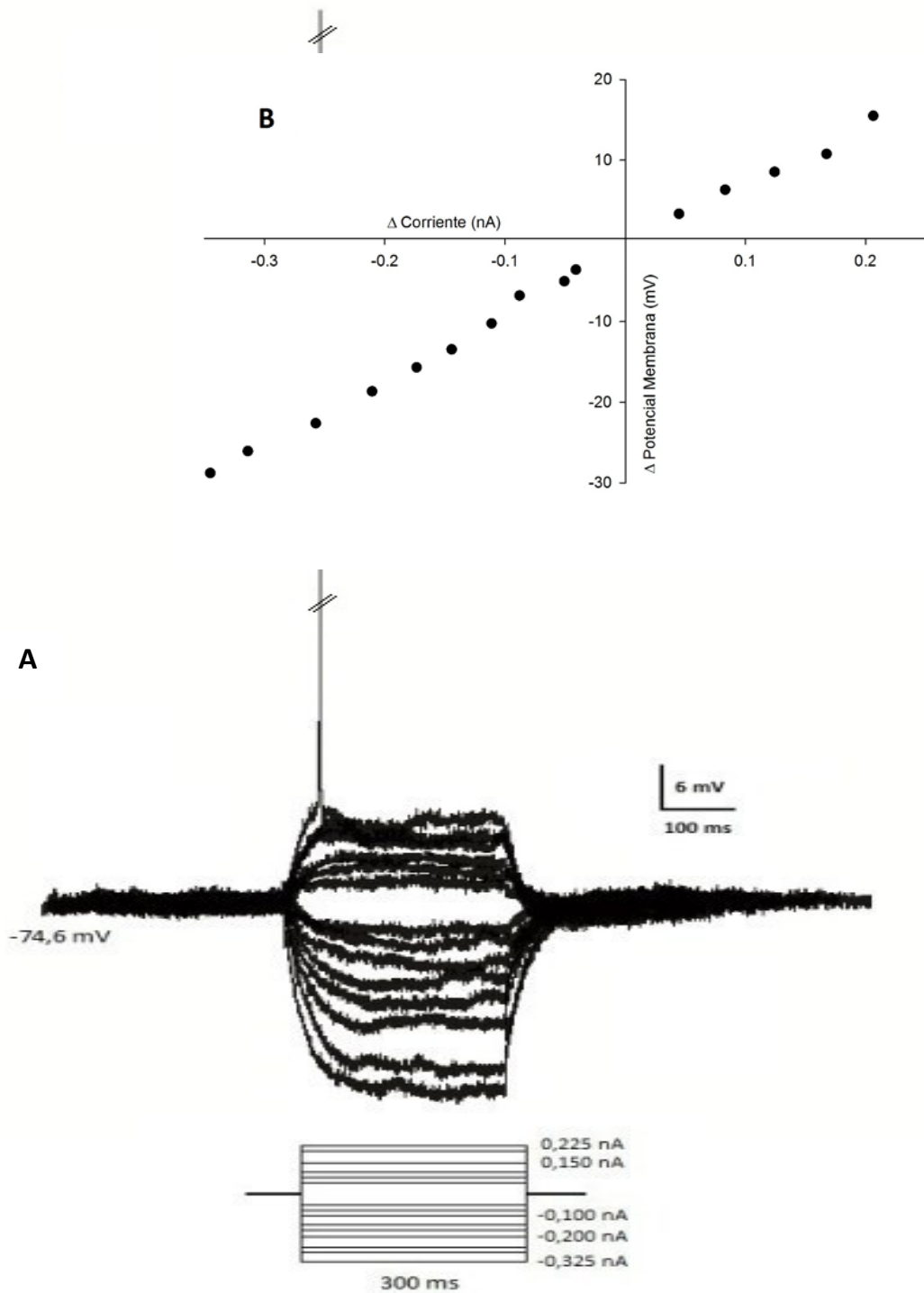


Figura 4.7 A. Respuesta de una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo a la inyección de pulsos de corriente hiperpolarizantes y despolarizantes. B. Curva corriente - voltaje en estado estacionario para la misma neurona. El potencial de membrana en reposo fue de  $-74,6 \text{ mV}$ . Los valores de voltaje se obtuvieron mediante la inyección de pulsos de corriente de  $300 \text{ ms}$  de duración a las intensidades observadas.

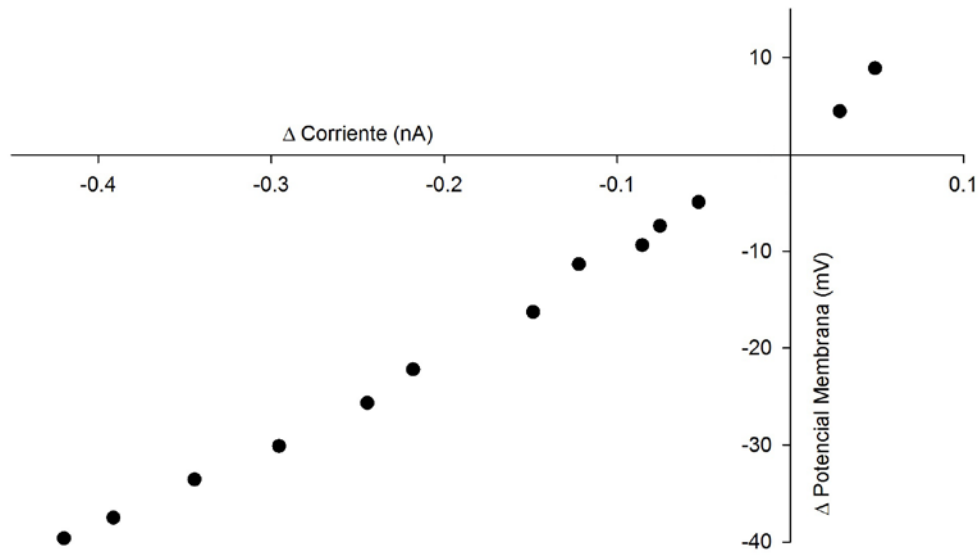
*Resultados*

Figura 4.8 Curva corriente - voltaje en estado estacionario para una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo donde se observan rectificaciones aparentes en los valores fisiológicos de voltaje.

## 4.2 ESTUDIO FARMACOLÓGICO.

El presente estudio incluye 51 neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo de la rata las cuales se sometieron a cinco protocolos generales para explorar elementos específicos de la vía de señalización muscarínica M1 (ver tabla 4.2).

### 4.2.1 UTILIZACIÓN DE ANTAGONISTAS MUSCARÍNICOS NO SELECTIVOS

Dentro de este protocolo se incluyen nueve neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo. Se observa que la aplicación de pulsos cuadrados de corriente, de naturaleza hiperpolarizante e intensidad constante; generó cambios en el potencial de membrana (control). Estos cambios fueron de menor amplitud, en presencia de atropina como antagonista no selectivo de los receptores muscarínicos, si se compara con los valores obtenidos en el periodo control. Estos cambios se revierten con la llegada del  $\beta$  – amiloide (25-35), el cual hace que la amplitud de los valores de potencial de membrana alcanzados con el pulso hiperpolarizante aumenten. Estos resultados se obtuvieron en todos los casos independientemente de la concentración de atropina utilizada y se ejemplifica en la figura 4.9. En este caso particular se observa como el potencial de membrana en reposo (-74 mV) alcanza valores de -87 mV al aplicar pulsos hiperpolarizantes de -0,12 nA de magnitud y 300 ms de duración, en ausencia del antagonista muscarínico (condiciones control); valores que disminuyen aproximándose a -82 mV en presencia de atropina y posteriormente aumentan a un valor medio de -93 mV con la adición del  $\beta$  – amiloide (25-35). En términos de la resistencia de entrada se observa una disminución de la misma con la llegada de atropina ( $RER = 0,904 \pm 0,027$ ), y un posterior aumento en presencia de  $\beta$  – amiloide (25-35) (1 $\mu$ M) ( $RER = 1,240 \pm 0,041$ ) (ver tabla 4.2 y figura 4.10).

La disminución en magnitud de las cifras de potencial de membrana alcanzado y de los valores de la resistencia de entrada neuronal que se presentan con la llegada del antagonista, así como sus posteriores incrementos con  $\beta$  – amiloide (25-35), junto al aumento en la pendiente de la curva coincidente con la llegada del péptido amiloide; son resultados compartidos en todos los casos en los cuales las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo se tratan inicialmente con un antagonista no selectivo de los receptores muscarínicos y posteriormente se añade el  $\beta$  – amiloide (25-35).

## Resultados

---

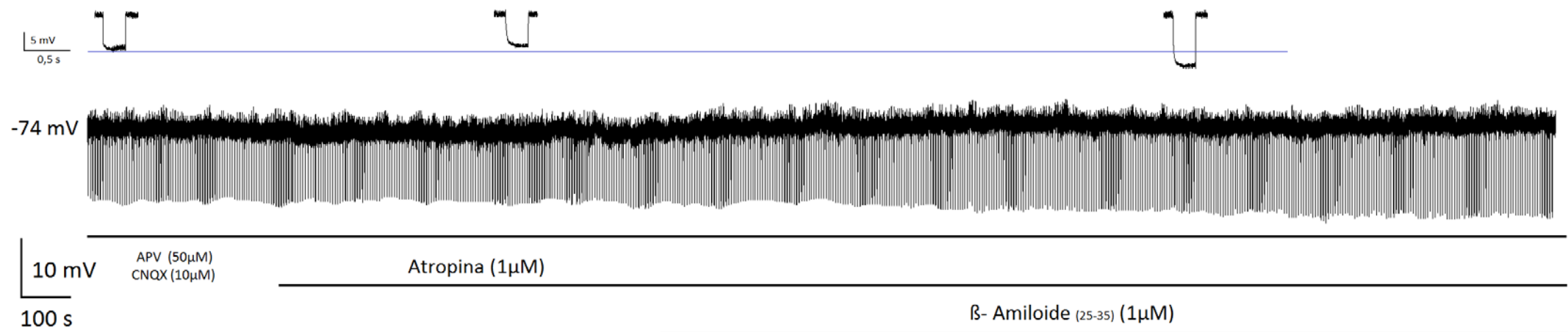
Específicamente en la neurona representada de la figura 4.10, se observa además como el aumento en la pendiente de la curva que representa la resistencia de la membrana, con la llegada del péptido amiloide disminuye conforme pasa el tiempo.

Con respecto a los valores de la resistencia de entrada observados se hace necesario señalar el mayor grado de dispersión de los mismos con la llegada del péptido amiloide, dispersión que va en aumento con forme incrementa el tiempo de estancia del mismo en el medio y que se ve reflejada parcialmente por los valores de la desviación estándar que acompañan el valor medio de la resistencia de entrada neuronal en presencia del  $\beta$  – amiloide <sup>(25-35)</sup> (ver figura 4.10).

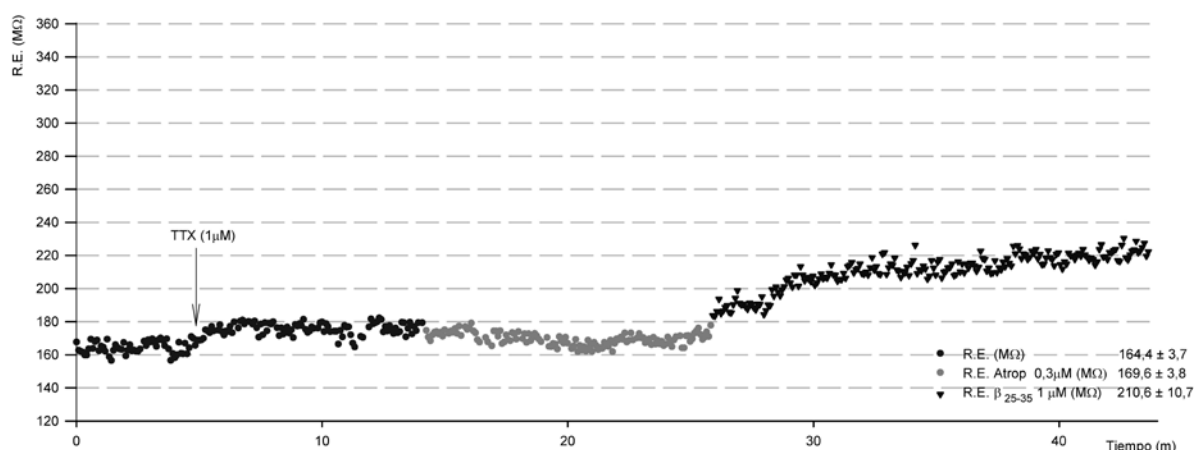
Esta mayor variabilidad de los valores de conductancia basal específicamente de la resistencia de entrada obtenidos en presencia del péptido  $\beta$  – amiloide se debe considerar como una constante para todas las neuronas analizadas en el presente trabajo experimental, sin importar el protocolo farmacológico al cual se ven sometidas.

El análisis estadístico de comparación de medias de la resistencia de entrada mediante la prueba *t* genera valores de  $p < 0,05$ ; en todos los casos, tanto cuando la comparación de medias se realiza entre S0 y S1 como entre S1 y S2 (ver sección 3.5 en *Materiales y Métodos*).

La determinación de la resistencia de entrada relativa (RER) en el estadio S1 evidencia una disminución cercana al 10% ( $0,904 \pm 0,027$ ) en los valores de la resistencia de entrada neuronal con la llegada del antagonista muscarínico no selectivo; y un aumento en dichos valores próximo al 25% ( $1,240 \pm 0,041$ ) en presencia del  $\beta$  – amiloide <sup>(25-35)</sup> (ver tabla 4.2).



**Figura 4.9** Registro intracelular en la modalidad de fijación de corriente de una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo en condiciones control y durante la perfusión con atropina y  $\beta$  – amiloide (25-35). Durante la realización del registro se utilizan pulsos de corriente hiperpolarizante de -0,12 nA y 300 ms de duración. Se utiliza APV a una concentración de 50 μM, CNQX a una concentración de 10 μM para el bloqueo de los receptores glutamatergicos y atropina a una concentración de 1 μM como antagonista muscarínico. El potencial de membrana en reposo de la célula es de -74 mV. La aplicación del pulso hiperpolarizante genera un cambio en el potencial cuya amplitud se reduce de forma significativa por la presencia de atropina (1 μM). La perfusión con  $\beta$  – amiloide (25-35) a una concentración de 1 μM genera un aumento mayor en dicha amplitud. En la parte superior del registro, en detalle, se representa el cambio de voltaje al pulso hiperpolarizante en las distintas condiciones.



**Figura 4.10 Variación de la resistencia de entrada (MΩ) con respecto al tiempo (m) en una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo en situación control y tras la perfusión con atropina y beta amiloide.** La perfusión con TTX aumenta la amplitud de la respuesta al pulso hiperpolarizante de forma significativa, la posterior perfusión con atropina mas β – amiloide (25-35) genera una mayor amplitud en respuesta al pulso hiperpolarizante. Se han utilizado pulsos de corriente de -0,098 nA y 300 ms de duración. El valor control de la resistencia de entrada es de 160 MΩ. Se ha perfundido la preparación con TTX a una concentración de 1 μM con el fin de disminuir el posible efecto de corrientes de sodio dependientes de voltaje. La atropina a una concentración de 0,3 μM bloquea los receptores muscarínicos, en estas condiciones se observa una pequeña disminución en la amplitud de la respuesta que vuelve a incrementarse por encima de los valores previos tras la perfusión con β – amiloide (25-35) a una concentración de 1 μM. La grafica corresponde a los valores promedio de la resistencia de entrada en los tres momentos y condiciones señalados: sin ninguna droga en el medio, en presencia de atropina y por último con β – amiloide (25-35).

#### 4.2.2 UTILIZACIÓN DE ANTAGONISTAS MUSCARÍNICOS SELECTIVOS PARA EL SUBTIPO M1.

De igual manera que con la utilización de antagonistas muscarínicos no selectivos, la aplicación de pulsos cuadrados de corriente, de naturaleza hiperpolarizante e intensidad constante, en las seis neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo incluidas en este tratamiento, generó cambios en los valores del potencial de membrana de menor amplitud en presencia del antagonista. Este resultado revierte con la llegada del β – amiloide (25-35), el cual produce un aumento en la amplitud de dichos valores (ver figura 4.11). El uso de pirenzepina a distintas concentraciones no evidencia diferencias en el comportamiento señalado anteriormente. En la figura 4.11 se observa como el potencial de membrana al aplicar pulsos hiperpolarizantes de 0,18 nA de amplitud y 500 ms de duración, en condiciones control, se desplaza de -69 mV (potencial de reposo) a -86 mV por efecto del pulso. La perfusión con pirenzepina (0,5 μM) hace que la amplitud de la respuesta disminuya hasta -80 mV. Por el contrario la perfusión con

## Resultados

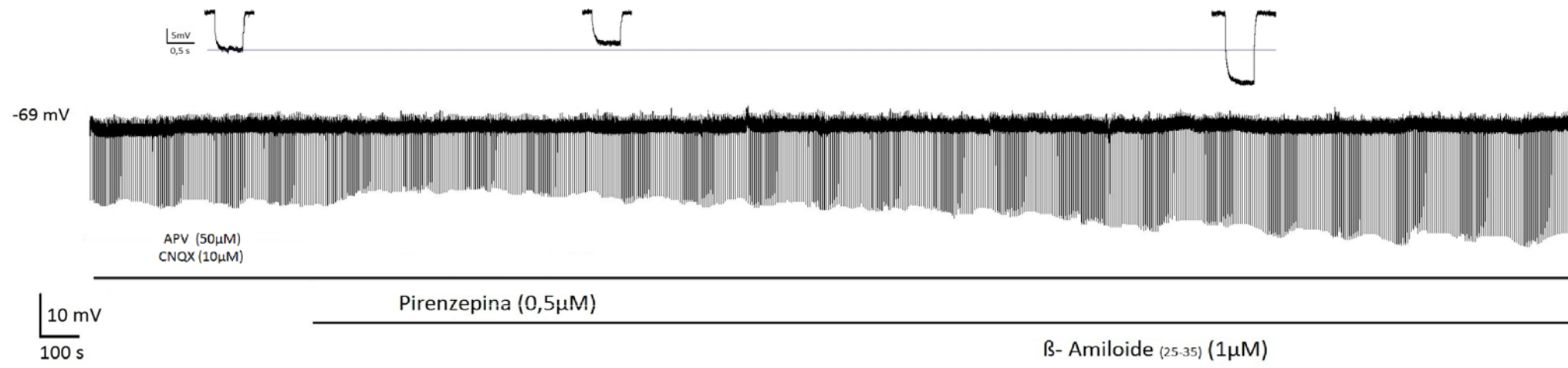
---

$\beta$  – amiloide<sup>(25-35)</sup> genera un aumento en dicha amplitud hasta alcanzar -90 mV en respuesta al mismo estímulo.

La resistencia de entrada se ve afectada de la misma forma que cuando se utilizaron antagonistas no selectivos de los receptores muscarínicos. En la figura 4.12 se observa una disminución importante en la resistencia de entrada neuronal, tras la perfusión con pirenzepina (en este caso utilizada a una concentración de 75nM) y un posterior aumento en los valores de la resistencia de entrada y de la pendiente de la curva en presencia del  $\beta$  – amiloide<sup>(25-35)</sup> (1 $\mu$ M). En este trabajo, todas las neuronas, perfundidas con antagonistas muscarínicos M1 selectivos mostraron un comportamiento similar.

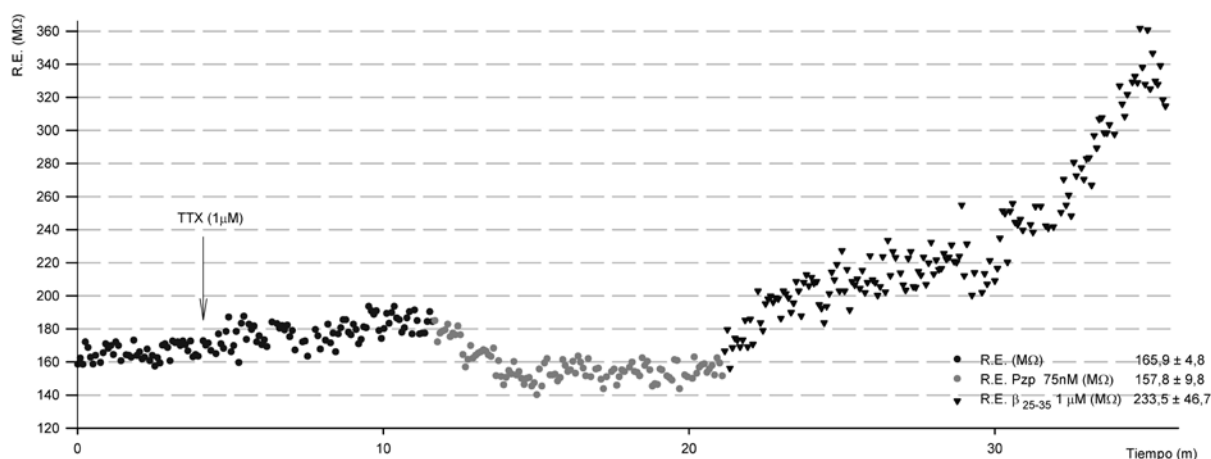
El análisis estadístico de comparación de medias de resistencia de entrada, por medio de la prueba *t* de Student se evidencia valores de  $p < 0,05$  en las comparaciones entre S0 y S1, y entre S1 y S2 (ver sección 3.5 en *Materiales y Métodos*) para cada una de las neuronas incluidas en el presente apartado.

Al igual que en el caso anterior, la presencia del antagonista muscarínico M1 selectivo produce: una disminución cercana al 10% en los valores de la resistencia de entrada en el estadio S1 (RER  $0,911 \pm 0,029$ ). En estas condiciones la perfusión con  $\beta$  – amiloide<sup>(25-35)</sup> produce un aumento añadido en los valores de la resistencia de entrada relativa (estadio S2) cercano al 30% (RER  $1,279 \pm 0,176$ ) (ver tabla 4.2).



**Figura 4.11 Registro intracelular en la modalidad de fijación de corriente de una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo en condiciones control y tras la perfusión con pirenzepina y  $\beta$  – amiloide (25-35).** Se muestran los valores del potencial de membrana alcanzados con la aplicación de pulsos de corriente de -0,18 nA de intensidad y 500 ms de duración. Se utiliza APV a una concentración de 50 μM, CNQX a una concentración de 10 μM como bloqueantes glutamatérgicos, y pirenzepina a una concentración de 0,5 μM como antagonista M1 selectivo. El potencial de membrana en reposo de la célula presenta un valor de - 69mV. El  $\beta$  – amiloide (25-35) se perfunde a una concentración de 1 μM. En la parte superior del registro destaca en detalle del cambio de voltaje en la membrana neuronal en distintos momentos, producido por la aplicación de un pulso de corriente hiperpolarizante de intensidad constante.



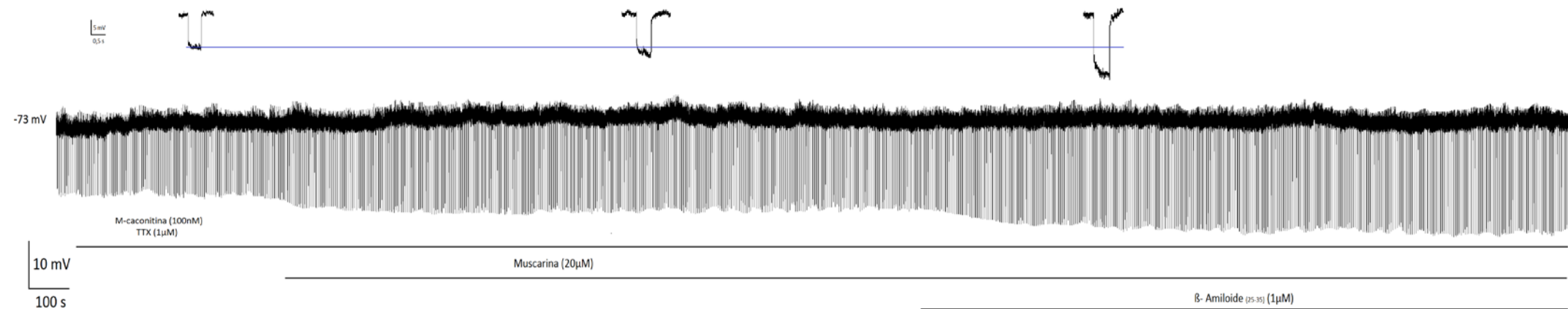


**Figura 4.12 Variación de la resistencia de entrada ( $M\Omega$ ) con respecto al tiempo (m) en una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo en estado de reposo y tras la perfusión de distintas drogas.** La célula es tratada previa a la llegada del  $\beta$  – amiloide (25-35) con un antagonista selectivo de los receptores muscarínicos subtipo M1. En esta neurona el valor inicial de la resistencia de entrada es cercano a los  $160 M\Omega$ , se perfundió con TTX a una concentración de  $1\mu M$  con la finalidad de bloquear canales de sodio, el antagonista M1 selectivo utilizado es pirenzepina a una concentración de  $75nM$  y el empleo de  $\beta$  – amiloide (25-35) a una concentración de  $1\mu M$ . Resultados obtenidos con la aplicación de pulsos de corriente de  $-0,091 nA$  de intensidad y  $300 ms$  de duración. La leyenda de la gráfica hace mención a los valores promedio de la resistencia de entrada en tres momentos: en condiciones control, en presencia del antagonista y por último con  $\beta$  – amiloide (25-35).

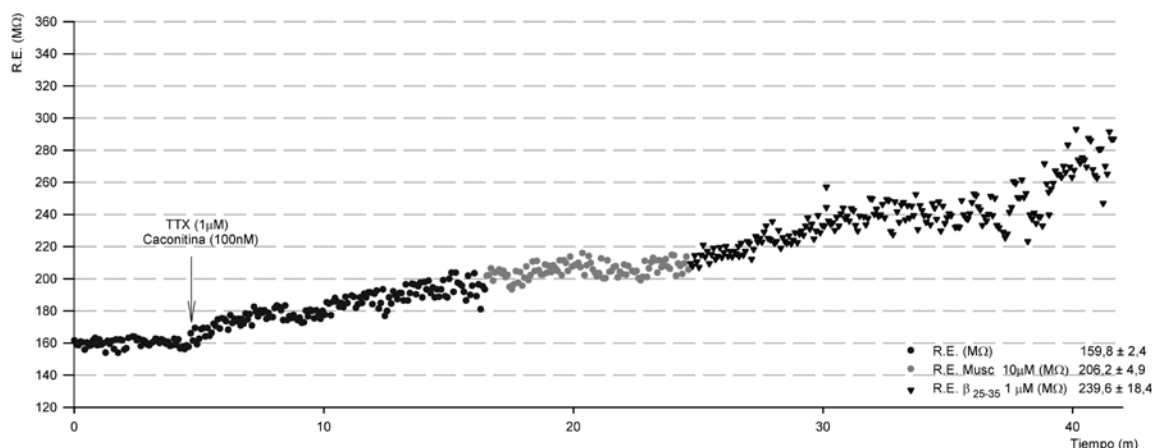
### 4.2.3 APLICACIÓN DE AGONISTAS MUSCARÍNICOS

En doce neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo se utilizaron agonistas de los receptores muscarínicos. La aplicación de pulsos cuadrados de corriente, de naturaleza hiperpolarizante e intensidad constante; generó cambios de potencial de membrana de mayor amplitud en presencia del agonista muscarínico. Con la adición del  $\beta$  – amiloide (25-35), al medio se observa un mayor aumento en la amplitud de las variaciones de potencial de membrana. Este comportamiento fue compartido por todos los agonistas muscarínicos utilizados (ver figuras 4.13 y 4.15).

Específicamente en la neurona representada en la figura 4.15 se observa como el potencial de membrana en reposo tiene un valor de  $-73 mV$  y alcanza valores de  $-84 mV$  en respuesta a los pulsos hiperpolarizantes de  $-0,1 nA$  de magnitud y  $500 ms$  de duración, en condiciones control. La presencia del agonista hace que la respuesta al pulso aumente a  $-89 mV$  y la perfusión con  $\beta$  – amiloide (25-35) genera un posterior incremento en la respuesta que sobrepasa  $-92 mV$ .



**Figura 4.13** Registro intracelular en la modalidad de fijación de corriente de una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo en situación control y tras la perfusión con muscarina y  $\beta$  – amiloide <sup>(25-35)</sup>. Se ha utilizado la M-caconitina a una concentración de 100nM, como bloqueante de los receptores nicotínicos. La TTX a una concentración de 1μM para el aislamiento funcional de la célula. La muscarina a una concentración de 20μM como agonista M1 no selectivo. La grafica muestra el registro continuo del potencial de membrana y su variación con los pulsos hiperpolarizantes de corriente de – 0,096 nA de intensidad y 500 ms de duración. En la parte superior del registro se representa, en detalle, el cambio de voltaje en la membrana neuronal en distintos momentos y condiciones (sin droga en el medio, en presencia del agonista y con  $\beta$  – amiloide <sup>(25-35)</sup>) producido por la aplicación de un pulso de corriente hiperpolarizante de intensidad constante.



**Figura 4.14 Variación de la resistencia de entrada ( $M\Omega$ ) con respecto al tiempo (m) en una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo.** La neurona es tratada, previamente a la llegada del  $\beta$  – amiloide (25-35), con un agonista no selectivo de los receptores muscarínicos subtipo M1. Registro obtenido mediante la inyección de pulsos de corriente de -0,092 nA de intensidad y 300 ms de duración. Tras el periodo inicial de registro (5 minutos aprox.) se perfunde con TTX (1 $\mu$ M) para aislar funcionalmente la célula registrada y caconitina (100nM) para bloquear los receptores nicotínicos. Posteriormente se utiliza muscarina a una concentración de 10 $\mu$ M como agonista M1 no selectivo y  $\beta$  – amiloide (25-35) a una concentración de 1 $\mu$ M. La gráfica representa los valores promedio de la resistencia de entrada que presenta la célula en tres condiciones: sin ninguna droga en el medio, en presencia de muscarina y por último con  $\beta$  – amiloide (25-35).

En ausencia de actividad espontánea, la perfusión con agonistas muscarínicos, genera un aumento en la resistencia de entrada de las neuronas de la región CA3 del hipocampo, este incremento se multiplica con la llegada del  $\beta$  – amiloide (25-35). Este tipo de comportamiento es similar en las neuronas analizadas (ver figuras 4.14 y 4.16) y se evidencia en la cuantificación de la resistencia de entrada relativa ( $RER = 1,129 \pm 0,036$ ) (ver tabla 4.2 sección Resultados).

En el 66,7% de las neuronas tratadas con agonistas muscarínicos previa adición de  $\beta$  – amiloide (25-35), se observa que el aumento en la resistencia de entrada generada por la llegada del péptido amiloide se presenta sin un incremento significativo en la pendiente de la curva (ver figuras 4.14 y 4.16).

La comparación de medias de la resistencia de entrada proporciona valores de  $p < 0,05$ ; al comparar las etapas S0 y S1, y entre S1 y S2; para cada una de las neuronas piramidales sometidas a este protocolo.

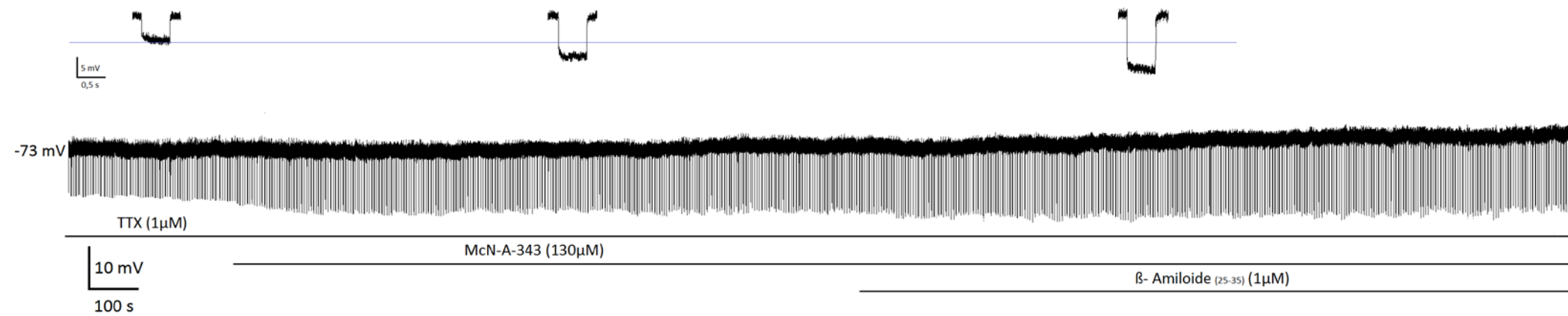
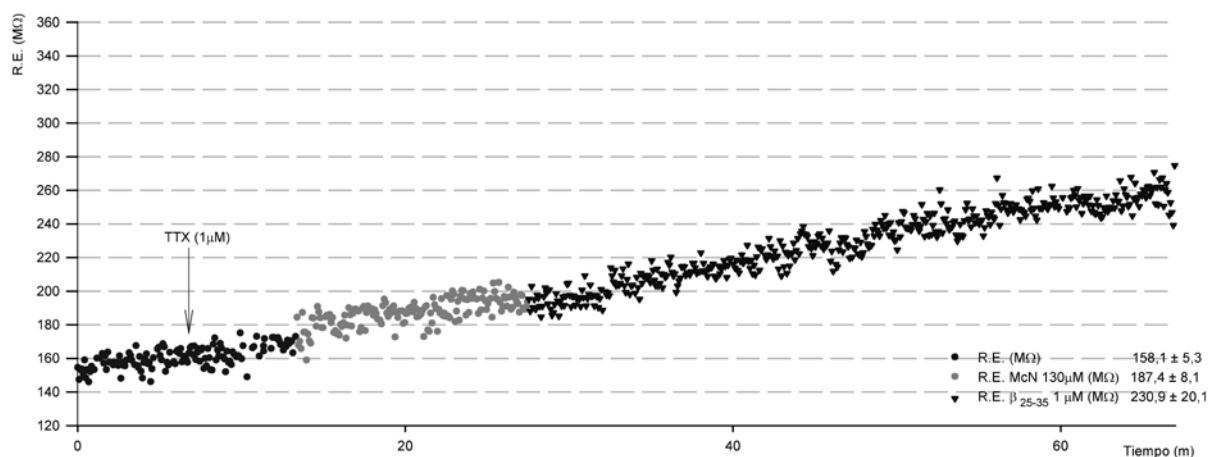


Figura 4.15 Registro intracelular en la modalidad de fijación de corriente de una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo en condiciones control, tras la perfusión con un agonista selectivo de los receptores muscarínicos subtipo M1 y finalmente tras perfundir con  $\beta$  – amiloide (25-35). Durante el registro se aplican pulsos de corriente hiperpolarizante de -0,1 nA de amplitud y 500 ms de duración. El potencial de membrana en reposo de la célula es de -73 mV, la perfusión con TTX (1 μM) para aislar funcionalmente la célula, y posteriormente con McN-A-343 a una concentración de 130 μM como agonista M1 selectivo. La posterior utilización de  $\beta$  – amiloide (25-35) a una concentración de 1 μM. genera un cambio de mayor amplitud en respuesta al pulso hiperpolarizante de intensidad constante.



**Figura 4.16 Variación de la resistencia de entrada ( $M\Omega$ ) con respecto al tiempo (m) en una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo perfundida con McN-A-343 y posteriormente con  $\beta$  – amiloide (25-35).** Los valores representados se obtienen a partir del registro intracelular en la modalidad de fijación de corriente donde se utilizan pulsos hiperpolarizantes de -0,1 nA y 500 ms de duración. El valor inicial de la resistencia de entrada fue cercano a los 160  $M\Omega$ , utilización de TTX a una concentración de 1  $\mu M$ , McN-A-343 a una concentración de 130  $\mu M$  como agonista M1 selectivo y  $\beta$  – amiloide (25-35) a una concentración de 1  $\mu M$ . La gráfica representa los valores promedio de la resistencia de entrada de la membrana neuronal en tres situaciones experimentales: control, en presencia del agonista y por último con  $\beta$  – amiloide (25-35).

#### 4.2.4 UTILIZACIÓN DE INHIBIDORES DE LA PROTEÍNA QUINASA C (PKC)

La perfusión con chelerytrine en las siete neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo donde se siguió este protocolo no generó variaciones en los valores del potencial de membrana en reposo. Sin embargo en presencia de la misma se observa que la magnitud de los valores de potencial de membrana alcanzados en las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo, al aplicar pulsos hiperpolarizantes de intensidad constante; aumenta con respecto a los valores iniciales donde el inhibidor de la PKC se encuentra ausente ( $RER = 1,143 \pm 0,076$ ). También se evidencia como tras la llegada del  $\beta$  – amiloide (25-35) la magnitud de dichos valores de potencial aumentan aún más (ver figura 4.17). La figura 4.17 muestra un ejemplo de este comportamiento, los pulsos hiperpolarizantes de -0,12 nA de magnitud y 500 ms de duración generan un cambio en el potencial de membrana de -76 mV en reposo a de -87 mV (en ausencia del inhibidor de la PKC), en presencia de chelerytrine se alcanza un potencial de -93 mV y con la adición del  $\beta$  – amiloide (25-35) se alcanzan valores cercanos a los -97 mV.

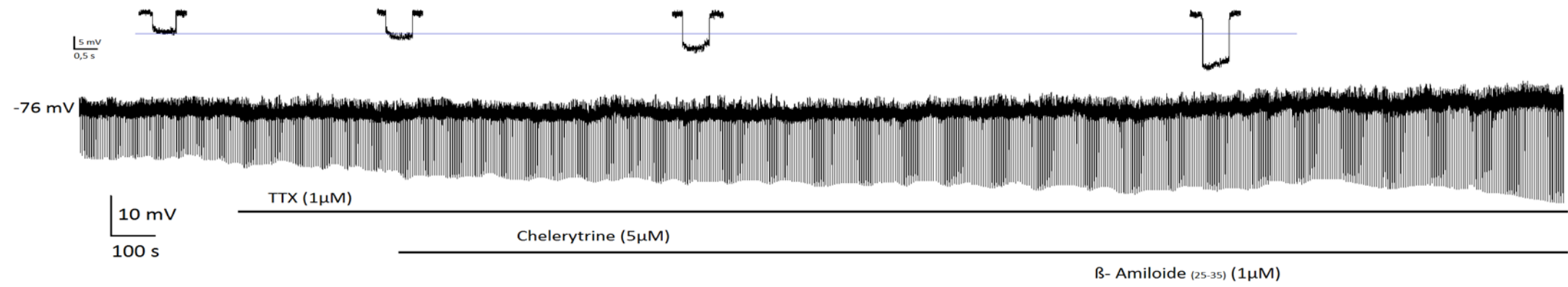
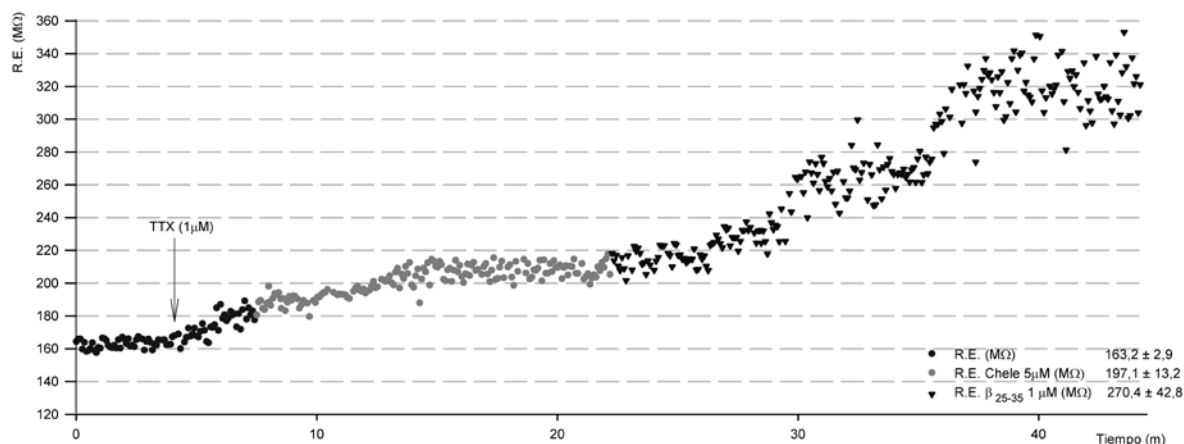


Figura 4.17 Registro intracelular en la modalidad de fijación de corriente de una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo en reposo, tratada con un inhibidor de la proteína quinasa C (PKC) y posteriormente con  $\beta$  - amiloide (25-35). Durante el registro se aplicaron pulsos de corriente hiperpolarizante de -0,12 nA de intensidad y 500 ms de duración. Se observan los cambios en el potencial de membrana de la célula por aplicación de dichos pulsos. Se perfundió con TTX (1 μM) (para aislar funcionalmente la célula). Se ha utilizado chelerytrine a una concentración de 5 μM como inhibidor permeable de la PKC y  $\beta$  - amiloide (25-35) a una concentración de 1 μM. Se representa el cambio de voltaje en la membrana producido por la aplicación de un pulso de corriente hiperpolarizante de intensidad constante en distintas situaciones experimentales.



**Figura 4.18 Variación de la resistencia de entrada ( $M\Omega$ ) con respecto al tiempo (m) en una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo en reposo tras la perfusión con un inhibidor de la proteína quinasa C y posteriormente con  $\beta$  – amiloide (25-35).** Resultados obtenidos al aplicar pulsos de corriente hiperpolarizante de -0,11 nA de amplitud y 300 ms de duración. El valor inicial de la resistencia de entrada en condiciones control es cercano a los 160  $M\Omega$ , la perfusión con TTX a una concentración de 1  $\mu M$  (5 minutos aprox.) y posteriormente de chelerytrine a una concentración de 5  $\mu M$  como inhibidor de la PKC generan un aumento de la resistencia de entrada. Posteriormente, la perfusión con  $\beta$  – amiloide (25-35) a una concentración de 1  $\mu M$  genera un mayor incremento de la resistencia de entrada. Se representan los valores promedio de la resistencia de entrada en tres momentos: sin ninguna droga en el medio, los efectos de la perfusión con TTX, en presencia de chelerytrine y con  $\beta$  – amiloide (25-35).

Esta variación se manifiesta en los valores de resistencia de entrada. Los resultados muestran un aumento inicial de la misma durante la perfusión con chelerytrine (5  $\mu M$ ) ( $RER = 1,143 \pm 0,076$ ), y un posterior aumento posterior generada por la presencia de  $\beta$  – amiloide (25-35) (1  $\mu M$ ) en el medio ( $RER 1,310 \pm 0,102$ ) (ver figura 4.18). También la adición del  $\beta$  – amiloide (25-35) genera un incremento en la pendiente de la curva de resistencia de entrada en función del tiempo.

El comportamiento descrito anteriormente se reitera en todas las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo incluidas en esta sección donde se utiliza chelerytrine como inhibidor de la PKC.

El análisis estadístico de comparación de medias de la resistencia de entrada proporciona valores de  $p < 0,05$  en todas las comparaciones entre S0 y S1, y entre S1 y S2 (ver sección 3.5 en *Materiales y Métodos*) para cada una de las neuronas incluidas en este apartado.

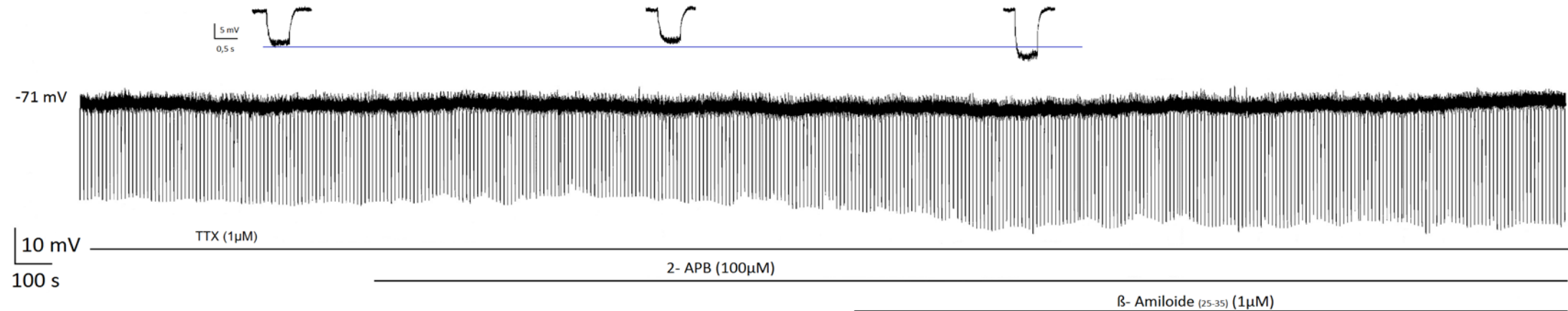
#### 4.2.5 UTILIZACIÓN DE ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR INTRACELULAR DE INOSITOL TRIFOSFATO (IP3)

El presente diseño incluye cinco neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo las cuales muestran cambios en la resistencia de membrana por el bloqueo de los receptores de IP3, semejantes a los descritos en las células tratadas con antagonistas de los receptores muscarínicos (ver sección 4.2.1). Durante la perfusión con 2-APB (100 $\mu$ M) antagonista del receptor intracelular de inositol trifosfato la respuesta al aplicar pulsos de corriente hiperpolarizante (-0,87 nA y 300ms) es menor que la observada en la situación control. En estas condiciones, la posterior perfusión con  $\beta$  – amiloide (25-35) produce un incremento en la magnitud de la respuesta al pulso (ver figura 4.19).

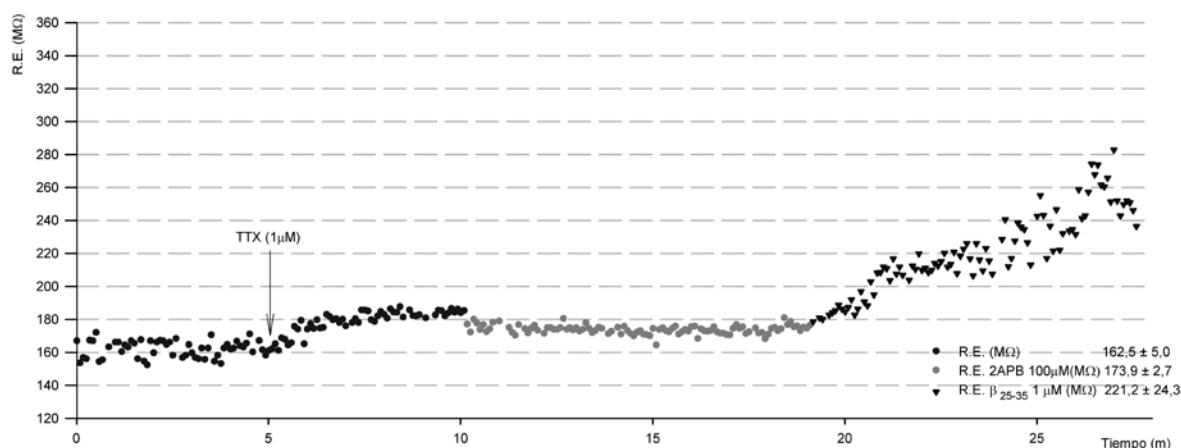
Los cambios en la conductancia basal se reflejan a través de cambios de la resistencia de entrada neuronal con respecto al tiempo, donde se evidencia una disminución en los valores coincidentes con la llegada del 2-APB y un posterior aumento de los mismos en presencia del  $\beta$  – amiloide (25-35). También se observa un aumento importante en la pendiente de la curva cuando se perfunde con el péptido amiloide (ver figura 4.20). La resistencia de entrada relativa antes de la llegada del  $\beta$  – amiloide (25-35) presenta un valor de  $0,926 \pm 0,033$ , mientras que el valor es de  $1,312 \pm 0,075$  tras la perfusión con  $\beta$  – amiloide (25-35) (ver tabla 4.2).

Al someter los valores de la resistencia de entrada encontrados en diferentes momentos a un análisis de comparación de medias; se obtienen valores de  $p < 0,05$  en todas las comparaciones entre S0 y S1, y entre S1 y S2 (ver sección 3.5 en *Materiales y Métodos*) para cada una de las neuronas.





**Figura 4.19** Registro intracelular en la modalidad de fijación de corriente de una neurona piramidal en reposo, de la región CA3 del hipocampo la cual se trata con un antagonista de los receptores de inositol trifosfato (IP3) previamente a la perfusión con  $\beta$  – amiloide (25-35). Durante el registro del potencial de membrana se aplicaron pulsos hiperpolarizantes de - 0,87 nA de intensidad y 300 ms de duración. El potencial de membrana en reposo de la célula fue de -71 mV, la perfusión con 2-APB a una concentración de 100 μM como antagonista permeable de los receptores de IP3 genera un cambio en la respuesta cuya amplitud se reduce de forma significativa. Mientras la perfusión con  $\beta$  – amiloide (25-35) a una concentración de 1 μM genera un aumento significativo de su amplitud. En la parte superior del registro se destaca en detalle el cambio de voltaje en la membrana neuronal en los distintos momentos producidos por la aplicación del pulso de corriente hiperpolarizante de intensidad constante.



**Figura 4.20 Variación de la resistencia de entrada (MΩ) con respecto al tiempo (m) para una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo tras la perfusión con un antagonista del receptor de IP3 y posteriormente con β – amiloide (25-35).** La resistencia de entrada calculada tras inyectar pulsos hiperpolarizantes de corriente de -0,90 nA de intensidad y 300 ms de duración presenta un valor inicial de 160 MΩ la perfusión con TTX a una concentración de 1 μM genera un aumento de la misma. Con la perfusión de 2-APB a una concentración de 100 μM no se observan modificaciones significativas en la resistencia de entrada pero si tras la perfusión con β – amiloide (25-35) a una concentración de 1 μM. Están representados los valores promedio de la resistencia de entrada en las tres condiciones: situación control, en presencia 2-APB y por último con β – amiloide (25-35).

#### 4.2.6 UTILIZACIÓN DE BLOQUEANTES DE CANALES DE POTASIO

La perfusión con bloqueantes de canales de potasio dependientes de voltaje tipo KCNQ posterior a la adición del TTX genera una ligera despolarización en todas las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo de rata incluidas en este protocolo. Sin embargo la magnitud de esta despolarización varía de acuerdo al bloqueante utilizado siendo menor en el caso de linopiridina, intermedia con el cloruro de bario y mayor con XE991. En todos los casos esta despolarización fue compensada con inyección de corriente.

Al aplicar pulsos de corriente hiperpolarizantes de intensidad constante a las neuronas registradas de la región CA3 del hipocampo bajo perfusión con Krebs normal se genera un cambio en el potencial de membrana. La perfusión con linopiridina (15 μM) bloqueante de los canales de potasio determina un aumento relativo en la magnitud de la variación de  $1,241 \pm 0,104$ . La posterior perfusión con β - amiloide incrementa dicha variación relativa a  $1,615 \pm 0,167$ . Estos resultados fueron repetitivos en todas las neuronas incluidas en este apartado. No

## Resultados

---

se observaron diferencias dependientes de la concentración de linopiridina utilizada. En el caso de la neurona representada en la figura 4.21 se observa como el potencial de membrana en reposo es de -69 mV y alcanza valores de -80 mV en respuesta al pulso hiperpolarizante de -0,1 nA de magnitud y 300 ms de duración. La amplitud de la respuesta sobrepasa los -83 mV en presencia de linopiridina (15  $\mu$ M) y alcanza cifras cercanas a los -90 mV con la adición del  $\beta$  – amiloide (25-35).

El cambio en la amplitud de la respuesta evidencia modificaciones en los valores de resistencia de entrada. La perfusión con linopiridina genera un aumento de la misma. Observándose un segundo aumento en estos valores con la presencia de  $\beta$  – amiloide (25-35), dichas modificaciones no se acompañan de incrementos en la pendiente de la curva de resistencia de entrada en función del tiempo (ver figura 4.22).

La comparación de medias de los valores de resistencia de entrada obtenidos genera valores de  $p < 0,05$ ; en todos los casos, tanto entre los estadios S0 y S1 así como entre los estadios S1 y S2 (ver sección 3.5 en *Materiales y Métodos*).

El cálculo de la resistencia de entrada relativa respecto a los valores control en presencia de linopiridina refleja un porcentaje de aumento en los valores de resistencia de entrada de un 18,8% (RER  $1,188 \pm 0,068$ ) y de 31,8% (RER  $1,318 \pm 0,121$ ) bajo perfusión con  $\beta$  – amiloide (25-35) (ver tabla 4.2).

Con el mismo protocolo experimental utilizando XE991 como bloqueante de canales KCNQ se observaron los siguientes resultados. En la figura 4.23 se observa como en condiciones control, la aplicación de pulsos hiperpolarizantes de -0,109 nA y 500 ms de duración generan un cambio en el potencial de membrana en reposo inicialmente en -71 mV a -85 mV. La perfusión con el bloqueante XE991 (6 $\mu$ M), produce un aumento en la amplitud de la respuesta hasta valores de -89 mV.

La posterior perfusión con  $\beta$  – amiloide (25-35) produce un aumento en la magnitud de la variación de potencial de membrana al estímulo; sin embargo se observa que dicho aumento es menor que el generado con protocolos anteriores, sin importar cual haya sido el protocolo farmacológico seguido. La adición del  $\beta$  – amiloide (25-35) genera que la respuesta al pulso hiperpolarizante pase de -89 mV a -91 mV (ver figura 4.23).

El cálculo de la resistencia de entrada en las tres condiciones da como resultado un aumento, muy marcado coincidente con la llegada del XE991 y un incremento posterior de

## Resultados

---

carácter más moderado con disminución en la pendiente cuando se perfunde con  $\beta$  – amiloide <sup>(25-35)</sup> (ver figura 4.24). El valor de la resistencia de entrada relativa promedio con la llegada del XE991 es de  $1.132 \pm 0,045$  y de  $1,090 \pm 0,017$  en presencia del  $\beta$  – amiloide <sup>(25-35)</sup>.

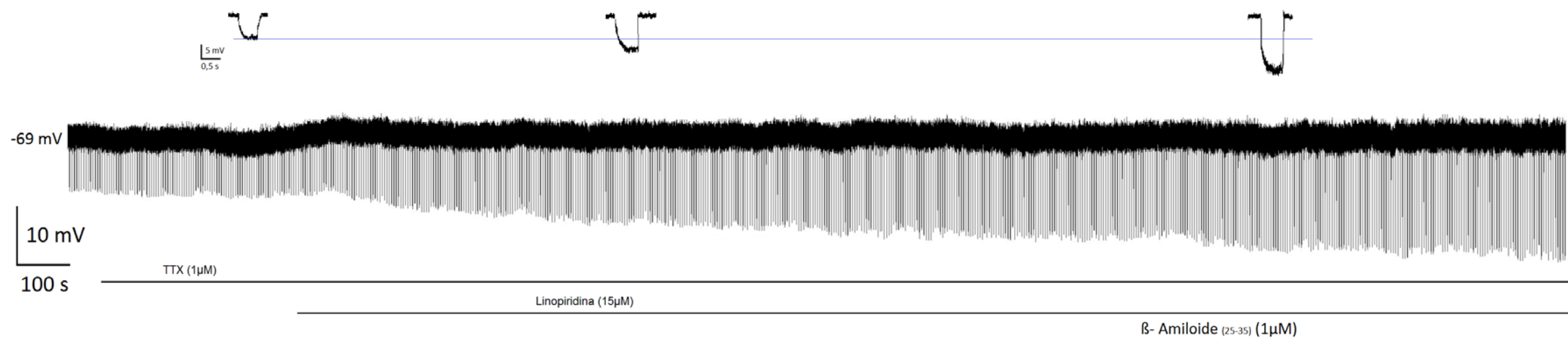
La comparación de medias de la resistencia de entrada en los tres estadios mediante la prueba *t* de Student proporciona valores de  $p < 0,05$ , para cada una de las neuronas piramidales sometidas a este protocolo al efectuar las comparaciones entre S0 y S1; y entre S1 y S2.

La utilización de cloruro de bario a una concentración de 3mM como bloqueante de canales de potasio KCNQ, previamente a la adición de  $\beta$  – amiloide <sup>(25-35)</sup> en las neuronas piramidales en estado basal de la región CA3 del hipocampo, genera resultados similares a los obtenidos con la utilización del XE991.

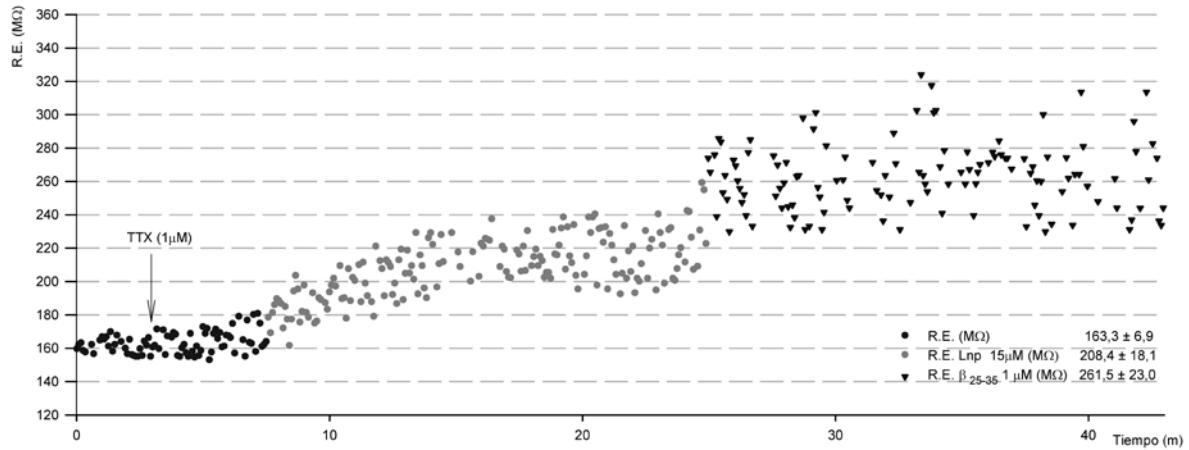
La figura 4.25 muestra el potencial de membrana en ausencia de bario (-67 mV), la aplicación del pulso hiperpolarizante genera una variación hasta -77 mV; tras la perfusión con cloruro de bario (3mM) la respuesta aumenta a valores cercanos a los -81 mV. La perfusión con  $\beta$  – amiloide <sup>(25-35)</sup> produce un posterior incremento aumento hasta valores de -84 mV.

Los valores de la resistencia de entrada relativa promediada para los datos obtenidos son: en presencia de bario en el medio  $1,159 \pm 0,071$ ; tras la perfusión con el péptido amiloide  $1,201 \pm 0,040$  (ver tabla 4.2 y figura 4.26).

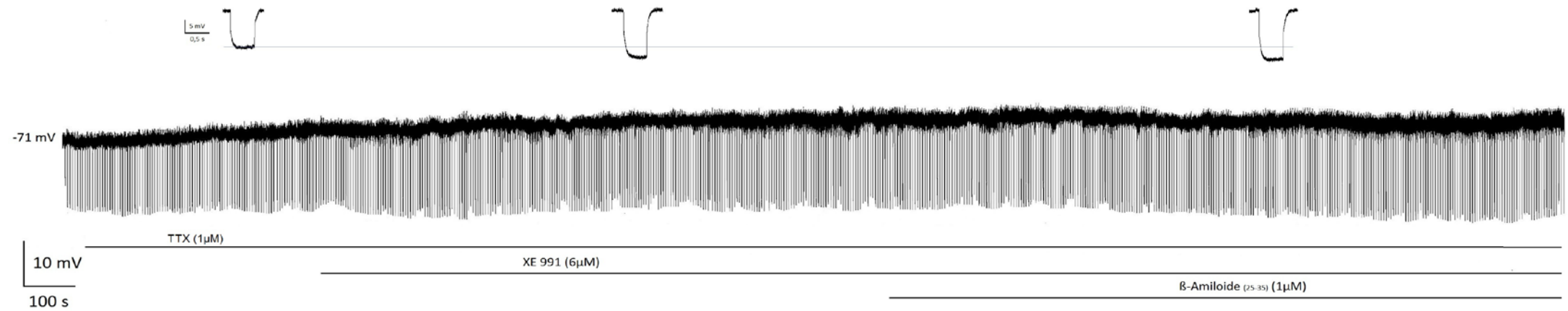
El análisis estadístico de comparación de medias de los valores de la resistencia de entrada genera valores de  $p < 0,05$ , para cada una de las neuronas piramidales sometidas a este protocolo al efectuar la comparación entre las etapas S0 y S1; y entre S1 y S2.



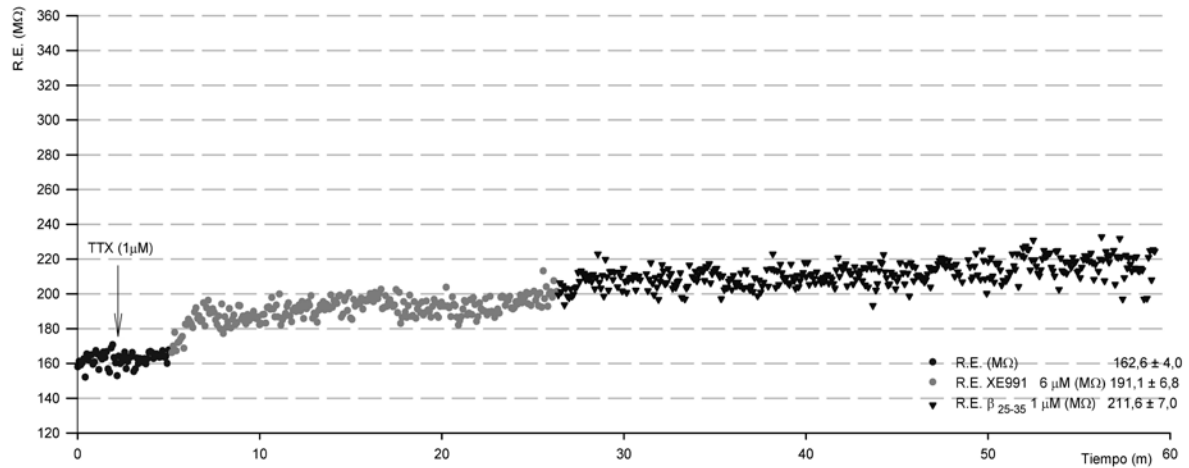
**Figura 4.21** Registro intracelular en la modalidad de fijación de corriente de una neurona piramidal en estado basal de la región CA3 del hipocampo en condiciones control y tras la perfusión con linopiridina como bloqueante del canal de potasio tipo KCNQ y posteriormente con  $\beta$  – amiloide (25-35). Registro del potencial de membrana con la aplicación de pulsos de corriente hiperpolarizante de -0,1 nA de intensidad y 300 ms de duración. El potencial de membrana en reposo es de -69 mV. Se perfundió con TTX para el aislamiento funcional y linopiridina en este caso a una concentración de 15  $\mu$ M como bloqueante de canales KCNQ. Como puede observarse la perfusión con  $\beta$  – amiloide (25-35) a una concentración de 1  $\mu$ M genera un cambio significativo en la respuesta al pulso hiperpolarizante. En la parte superior del registro destaca en detalle el cambio de voltaje de la membrana neuronal producido por la aplicación de un pulso de corriente hiperpolarizante de intensidad constante.



**Figura 4.22 Variación de la resistencia de entrada (MΩ) con respecto al tiempo (m) en una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo en condiciones control, tras la perfusión con linopiridina (bloqueante de canales de potasio KCNQ) y con β – amiloide (25-35).** Los valores representados se obtienen a partir del análisis del registro intracelular en la modalidad de fijación de corriente donde se utilizan pulsos hiperpolarizantes de -0,1 nA y 300 ms de duración. El valor inicial de la resistencia de entrada es cercano a los 160 MΩ la perfusión con TTX (1 μM) y con linopiridina a una concentración de 15 μM incrementa dicha resistencia que vuelve a incrementarse bajo perfusión con β – amiloide (25-35) a una concentración de 1 μM. Están representados los valores promedio de la resistencia de entrada en tres condiciones: condición control, en presencia de linopiridina y con β – amiloide (25-35).

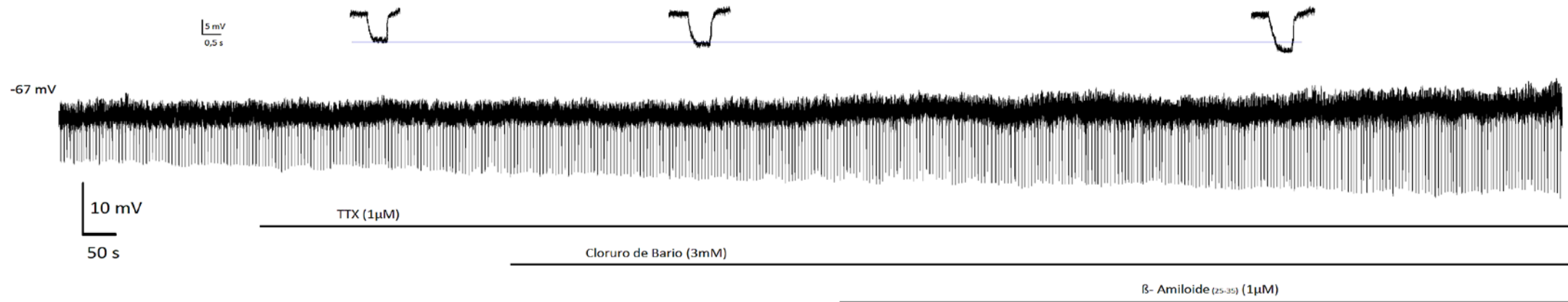


**Figura 4.23** Registro intracelular en la modalidad de fijación de corriente de una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo en condiciones control, tras la perfusión con XE991 bloqueante de los canales de potasio KCNQ y posteriormente con  $\beta$  – amiloide (25-35). Durante la realización del registro se utilizan pulsos de corriente hiperpolarizante de -0,109 nA y 500 ms de duración. El potencial de membrana en reposo de la célula es de -71 mV. La perfusión con TTX a 1  $\mu$ M aísla la célula y el XE991 a una concentración de 6  $\mu$ M como bloqueante de los canales KCNQ incrementa la respuesta al pulso hiperpolarizante. La perfusión con de  $\beta$  – amiloide (25-35) a una concentración de 1  $\mu$ M no modifica significativamente esta respuesta. En la parte superior del registro, en detalle, se representa el cambio de voltaje a la aplicación del pulso hiperpolarizante en los distintos tiempos y condiciones



**Figura 4.24 Variación de la resistencia de entrada (MΩ) con respecto al tiempo (m) en una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo en condiciones control y tras la perfusión con XE991 y posteriormente con  $\beta$  - amiloide (25-35).** Los valores representados se obtienen a partir del registro intracelular en la modalidad de fijación de corriente donde se utilizan pulsos hiperpolarizantes de -0,11 nA de magnitud y 500 ms de duración. El valor inicial de la resistencia de entrada fue de 160 MΩ. La aplicación de de TTX (1μM) aísla la célula y el XE991 (6μM) como bloqueante de la corriente M aumenta de forma significativa la resistencia de entrada. La posterior perfusión con  $\beta$  - amiloide (25-35) a una concentración de 1μM no modifica estos valores. Se representan los valores promedio de la resistencia de entrada en las tres condiciones: control, en presencia del bloqueante y por último con  $\beta$  - amiloide (25-35).





**Figura 4.25** Registro intracelular en la modalidad de fijación de corriente de una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo en condiciones control y tras la perfusión con cloruro de bario y posteriormente con del  $\beta$  – amiloide (25-35). Registro continuo del potencial de membrana y su variación por la aplicación de pulsos hiperpolarizantes intracelulares de corriente de -0,09 nA de intensidad y 300 ms de duración. El potencial de membrana en reposo de la célula es de -67 mV. La perfusión con bario (3mM, bloqueante de canales de potasio) incrementa significativamente la respuesta al pulso hiperpolarizante. La posterior perfusión con  $\beta$  – amiloide (25-35) a una concentración de 1 μM continua generando aumentos en esta respuesta. En la parte superior del registro, en detalle, se representa la respuesta al pulso hiperpolarizante en distintos momentos y condiciones.

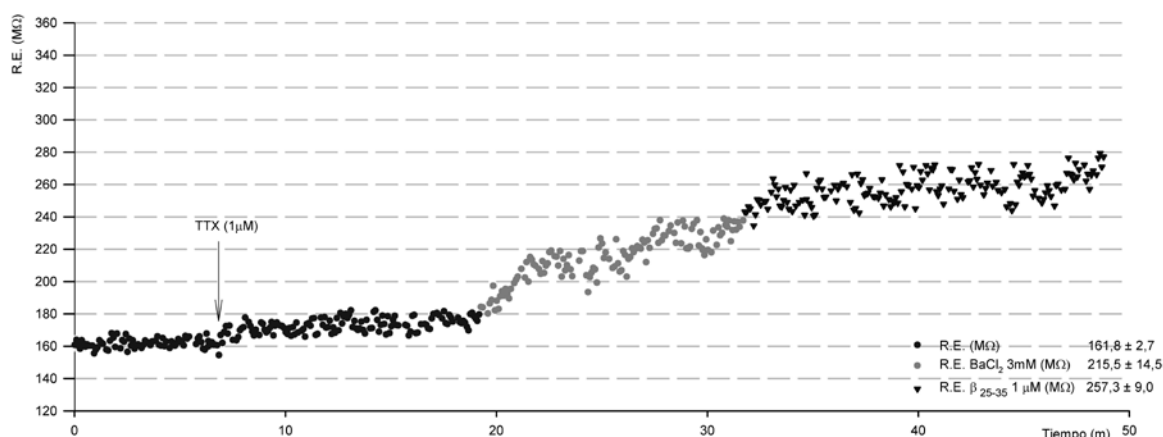


Figura 4.26 Variación de la resistencia de entrada (MΩ) con respecto al tiempo (m) para una neurona piramidal de la región CA3 del hipocampo en condiciones control y tras la perfusión con cloruro de bario y beta amiloide. Los valores representados se obtienen a partir del registro intracelular en la modalidad de fijación de corriente donde se utilizan pulsos hiperpolarizantes de -0,11 nA de magnitud y 500 ms de duración. El valor inicial de la resistencia de entrada es de 160 MΩ. La aplicación de de TTX (1μM), y cloruro de Bario (3mM) como bloqueante de la corriente M aumenta de forma significativa la resistencia de entrada. La posterior perfusión con β – amiloide (25-35) a una concentración de 1μM aumenta significativamente estos valores. Se representan los valores promedio de la resistencia de entrada en las tres condiciones: control, en presencia del bloqueante y por último con β – amiloide (25-35). Se representan los valores promedio de la resistencia de entrada en momentos y condiciones distintos: control, en presencia de cloruro de bario y por último con β – amiloide (25-35).

Tabla 4.2. Resistencia de entrada relativa de neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo según protocolo utilizado en dos estadios distintos (S1, S2). Los valores representados corresponden al valor promedio ± desviación estándar. Las determinaciones se realizan para cada neurona en dos condiciones: en presencia del fármaco utilizado en los distintos protocolos de estudio, y después de añadir el péptido β – amiloide (25-35). En cada caso para la determinación de la resistencia de entrada relativa se toma como referencia los valores de resistencia de entrada correspondientes al estadio anterior.

Protocolo	Resistencia de Entrada Relativa		
	n	S1	S2
(1) Antagonistas no selectivos	9	0,904 ± 0,027	1,240 ± 0,041
(2) Antagonistas M1 selectivos	6	0,911 ± 0,029	1,279 ± 0,176
(3) Agonistas no selectivos	12	1,129 ± 0,036	1,278 ± 0,171
(4) Inhibidores de la PKC	7	1,143 ± 0,076	1,310 ± 0,102
(5) Inhibidores receptor de IP3	5	0,926 ± 0,033	1,312 ± 0,075
Bloqueantes canal KCNQ			
(6) Linopiridina	3	1,188 ± 0,068	1,318 ± 0,121
(7) XE 991	4	1,132 ± 0,045	1,090 ± 0,017
(8) Bario	5	1,159 ± 0,071	1,174 ± 0,069

#### 4.2.7 ANÁLISIS DE DATOS

Al observar los valores relativos de la resistencia de entrada en la condición 1 (S1) se evidencian dos grupos principales. El primer grupo formado por aquellas células donde se han utilizado antagonistas de los receptores muscarínicos subtipo M1 tanto selectivos como no selectivos y los inhibidores del receptor de inositol trifosfato (valores en morado tabla 4.2). En este grupo el valor de la resistencia de entrada relativa es siempre menor al valor unitario. Mientras que en el segundo grupo formado por las células donde se han utilizado agonistas de los receptores muscarínicos subtipo M1, inhibidores de la PKC y los bloqueantes del canal de potasio KCNQ; el valor de la resistencia de entrada relativa es mayor a la unidad (valores en blanco tabla 4.2).

En la condición donde se añade  $\beta$  – amiloide <sup>(25-35)</sup> estadio (S2), independientemente de la sustancia previa añadida al líquido de perfusión de se observa que todos los valores son mayores a uno, sin embargo, se pueden diferenciar tres grupos de acuerdo a la magnitud del aumento de la resistencia de entrada en reposo. El primer grupo conformado por las células donde se utilizaron antagonistas no selectivos de los receptores muscarínicos subtipo M1, antagonistas selectivos de los receptores muscarínicos subtipo M1, agonistas de los receptores muscarínicos subtipo M1, inhibidores de la PKC, inhibidores del receptor de inositol trifosfato y linopiridina. En estos casos el valor de la resistencia de entrada relativa presenta un aumento mayor al 20% en presencia del  $\beta$  – amiloide <sup>(25-35)</sup> (ver valores en rosa tabla 4.2).

El segundo grupo está conformado por las células donde se utilizó cloruro de bario previo a la adición del  $\beta$  – amiloide <sup>(25-35)</sup> (valor en celeste tabla 4.2). En este caso el aumento en la resistencia de entrada relativa en presencia del  $\beta$  – amiloide <sup>(25-35)</sup> fue a un menor al 20%. Y un tercer grupo conformado por las células perfundidas con XE991 previamente a la adición del  $\beta$  – amiloide <sup>(25-35)</sup>. En estos casos, el valor de la resistencia de entrada relativa aumentó menos del 10% después de la perfusión con  $\beta$  – amiloide <sup>(25-35)</sup> (ver valor en amarillo tabla 4.2).

El análisis de los resultados demuestra que la resistencia de entrada relativa en presencia de  $\beta$  – amiloide entre los distintos protocolos farmacológicos (1 al 8 ver tabla 4.2) presenta diferencias entre grupos mayores a las que cabría esperar por azar ( $p = 0,029$ ). Asimismo el análisis de subgrupos señala diferencias estadísticas entre los primeros 6 grupos y los grupos 7 y 8.

Por otro lado, el análisis estadístico de la resistencia de entrada relativa en presencia de  $\beta$  – amiloide entre los primeros seis protocolos farmacológicos indica que no hay diferencias

### *Resultados*

---

estadísticamente significativas entre grupos ( $p > 0,05$ ). A su vez la comparación de medias entre los grupos 7 y 8, confirma la existencia de diferencias significativas en los resultados obtenidos para las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo tratadas con bario ó XE991 ( $p < 0,05$ ).

## **5. DISCUSIÓN**

La adquisición de nuevos conocimientos mediante el procesamiento de información y el almacenamiento de los mismos constituyen funciones transcendentales del sistema nervioso, donde intervienen numerosas estructuras y varios sistemas de neurotransmisión. En la enfermedad de Alzheimer cambios funcionales en estructuras cerebrales como la formación hipocampal y modificaciones en los sistemas de neurotransmisión como el colinérgico se asocian a alteraciones características en memoria y aprendizaje como la incapacidad de incorporar nuevos recuerdos. De acuerdo con lo anteriormente expuesto y a la falta de efectividad de terapéutica actual en el tratamiento de la EA; la investigación continua de procesos fisiopatológicos que subyacen dicha enfermedad constituye una necesidad. En el presente trabajo se analiza el efecto que la exposición aguda al péptido  $\beta$  – amiloide (25-35) tiene sobre las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo.

## 5.1 ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO

El trabajo experimental descrito se ha llevado a cabo en rodajas de cerebro que contenían la región CA3 del hipocampo de rata, mediante la técnica de registro intracelular en la modalidad de fijación de corriente (*current – clamp*).

### 5.1.1 CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA Y TIPOS CELULARES IDENTIFICADOS EN LA REGIÓN CA3 DEL HIPOCAMPO DE LA RATA

Como se describió en la sección 4.1.1 (ver sección de *Resultados*), las neuronas de la región CA3 del hipocampo registradas intracelularmente se han distribuido en dos grupos. Se clasifican como neuronas piramidales aquellas donde se identifica, posterior a la descarga, una posthiperpolarización con tres fases definidas (Storm, 1987; Storm, 1990) (ver figura 4.1). Constituida por una posthiperpolarización rápida (fAHP) producto de un cambio en la conductancia rápida de potasio activada por voltaje y iones calcio denominada  $I_c$  o BK; una postdespolarización (ADP) debida parcialmente a una corriente de cola de calcio mediada por canales tipo R y a la corriente persistente de sodio (Yue y cols, 2005b; Sipilä y cols, 2006) y una fase de posthiperpolarización posterior (AHP). Está última compuesta por una posthiperpolarización media (mAHP) y una posthiperpolarización tardía lenta (sAHP).

La posthiperpolarización media generalmente se presenta a tiempos mayores a 100ms después de la despolarización y tradicionalmente se establece que es consecuencia de la  $I_M$  y la  $I_C$ , aunque la participación de ésta ha sido últimamente descartada para neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo (Gu y cols, 2005).

La sAHP que normalmente alcanza su valor máximo entre los 400 y 700 ms posteriores a la despolarización se debe a un aumento en la conductancia de potasio lenta mediada por canales tipo SK producto de cambios en el calcio intracelular (Faber y Sah, 2002; Podlogar y Dietrich, 2006; Spruston y McBain, 2007) (ver figura 4.1).

Las neuronas registradas que tras el disparo presentaban una posthiperpolarización monofásica se clasificaron como no piramidales y se descartaron del estudio ya que de acuerdo a sus propiedades electrofisiológicas éstas presentaban una mayor similitud con interneuronas (Chitwood y cols, 1999).

### 5.1.2 CARACTERÍSTICAS ELECTROFISIOLÓGICAS DE LAS NEURONAS PIRAMIDALES DE LA REGION CA3 DEL HIPOCAMPO DE LA RATA

A su vez, (sección 4.1.2 de *Resultados*), las neuronas de la región CA3 del hipocampo registradas intracelularmente y clasificadas como neuronas piramidales; se clasificaron en tres grupos según el patrón de disparo (espiga única, fásicas ó tónicas) (ver figura 4.2) generado al aplicar pulsos de corriente despolarizante.

En concordancia con otros estudios en el presente trabajo, las neuronas de la región CA3 del hipocampo identificadas como piramidales y clasificadas según su patrón de disparo muestran características comunes a las descritas para este tipo neuronal por otros autores. Tal es el caso de los resultados descritos por: Spruston y Johnston (1992) al caracterizar las propiedades de la membrana de los principales tipos neuronales a nivel hipocampal, Dégenètaris y cols (2002) al caracterizar las propiedades electrofisiológicas de neuronas piramidales en la corteza prefrontal de la rata mediante registros intracelulares, Podlogar y Dietrich (2006) al determinar patrones de disparo de neuronas hipocampales en rata y Hemond

y cols (2008) al estudiar los patrones de disparo de las neuronas piramidales de la región CA3b del hipocampo de la rata.

Al igual que en los estudios realizados por Spruston y Johnston (1992) y Hemond y cols (2008) la principal respuesta obtenida al inyectar corriente despolarizante de baja magnitud al soma de las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo fue la generación de un patrón de disparo que consta de un solo potencial de acción (ver figura 4.3). Las neuronas que exhiben este comportamiento se caracterizan por la presencia de una despolarización rápida y transitoria cuya amplitud (71,3 – 109,8 mV) y duración media ( $1,74 \pm 0,65$  ms) son similares a los expuestos por Spruston y McBain (2007); de la misma forma los valores de potencial de membrana en reposo ( $71,5 \pm 5,3$  mV), resistencia de entrada ( $162,4 \pm 4,3$  M $\Omega$ ), potencial umbral ( $55,2 \pm 4,8$  mV) y duraciones de las distintas fases de la posthiperpolarización obtenidos en la presente investigación se asemejan a los datos descritos por otros autores.

Posterior a la despolarización rápida en este tipo de neuronas se evidencia una repolarización y la posthiperpolarización trifásica analizada anteriormente (ver figuras 4.1 y 4.3).

La presencia de una hiperpolarización variable en el valor del potencial de membrana en reposo coincidente con la terminación del pulso despolarizante (ver tabla 4.1) en un porcentaje importante de estas neuronas ha sido igualmente observado por Dégenètaries y cols (2002) en otras neuronas piramidales.

El segundo tipo de respuesta obtenida al inyectar de forma transitoria y rápida una corriente despolarizante de baja magnitud al soma de las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo fue la generación de un patrón de disparo en fases o brotes; las principales características de dicho comportamiento de igual forma se encuentran ampliamente descritas (Madison y Nicoll, 1984; Spruston y Johnston, 1992; Podlogar y Dietrich, 2006).

Podlogar y Dietrich (2006) mencionan que las neuronas piramidales del hipocampo se caracterizan por la presencia de una rápida y prominente adaptación en la frecuencia de descarga (SFA). Esta adaptabilidad en la frecuencia de descarga constituye una de las principales propiedades de las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo que muestran descargas en fases y pudo ser observada en el presente trabajo ya que solamente en un 12,5% de los casos las descargas se mantienen por un tiempo mayor a la mitad de la duración del estímulo (ver figura 4.4). La SFA es un fenómeno que se produce debido a la activación gradual de conductancias de potasio como la  $I_M$  y la  $I_{AHP}$  (Miceli y cols, 2008; Brown y Passmore, 2009). Es importante mencionar que en el presente trabajo la SFA observada en las



neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo se produce tanto entre descargas independientes como entre descargas múltiples de un mismo tren (ver figura 4.4).

En la mayoría de estas neuronas también se evidencia la presencia de una hiperpolarización al finalizar el pulso despolarizante, sin embargo ésta presenta una magnitud mayor que la observada en el caso de las neuronas que presentan descargas únicas, aspecto consistente con lo reportado por Dégenètares y cols (2002).

El tercer tipo son neuronas que presentan un patrón continuo de disparo, la descarga se mantienen abarcando la totalidad del pulso aplicado mostrando una pobre adaptación en la frecuencia (ver figura 4.5); constituyen el grupo más pequeño identificado en la presente investigación. Este comportamiento ha sido descrito por varios autores, se denomina como tónico o de adaptación lenta y se caracteriza por una atenuación en el mecanismo de adaptación que puede ser producto de una disminución en la  $I_M$  y/u otras conductancias de potasio lentas dependientes de calcio (Dégenètares y cols, 2002; Podlogar y Dietrich, 2006). En las neuronas de adaptación lenta también se evidencia la presencia de una hiperpolarización al final del pulso despolarizante, cuyo valor es menor si se compara con los valores de los patrones anteriores, sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa (ver tabla 4.1)

En las neuronas piramidales es más frecuente observar comportamientos fásicos o tónicos conforme se aumenta la magnitud del estímulo despolarizante aplicado (Spruston y McBain, 2007). Sin embargo, debido a que en la presente investigación la clasificación según patrón de disparo se realizó mediante la aplicación de la menor intensidad de corriente despolarizante capaz de producir el potencial de acción y a que los patrones de disparo están determinados principalmente por la magnitud y temporalidad de la transmisión sináptica así como por las características neuronales; las variaciones encontradas parecen estar más relacionadas con aspectos como: ubicación dentro de CA3 y/o variaciones en las propiedades intrínsecas como: localización, distribución y densidad de conductancias (Masukawa y cols, 1982; Spruston y McBain, 2007; Hemond y cols, 2008). Aspectos capaces de generar respuestas de distinta morfología ante el mismo estímulo despolarizante sin ocasionar afectaciones considerables en las principales propiedades electrofisiológicas del grupo (ver tabla 4.1).

De igual forma las diferencias en el tiempo de inicio de la respuesta propagada clasifican al 74,5% de la totalidad de las neuronas como de efecto inmediato ya que la aparición del potencial de acción se da durante el primer tercio de la duración; también estarían en

relación con variaciones en las propiedades neuronales intrínsecas como las mencionadas anteriormente. Ya se ha establecido que el retraso en la primera espiga puede estar parcialmente determinado por la activación o inactivación de corrientes subumbrales de potasio principalmente de inactivación rápida tipo A y de inactivación lenta tipo D (Storm, 1990).

En términos generales y como se observa en la tabla 4.1 las principales propiedades electrofisiológicas no muestran variaciones evidentes entre grupos. Así por ejemplo si se comparan los valores del potencial umbral en las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo registradas, en todos los casos independientemente de su patrón de disparo se requiere una despolarización cercana a los 20mV para alcanzar dicho valor situación acorde con los resultados expuestos por Hemond y cols (2008).

Estas similitudes se ponen de manifiesto al no encontrarse diferencias significativas en el potencial de membrana en reposo, la reobase, el potencial umbral, la amplitud de descarga, la duración potencial, el valor subumbral, la posthiperpolarización rápida y la postdespolarización; entre los grupos. Resultados semejantes se obtienen al realizar la comparación según patrón de disparo de las variables: resistencia de entrada, tiempo de despolarización, tiempo de repolarización y duración media del potencial. Estas similitudes entre grupos refuerzan la pertenencia al mismo tipo neuronal.

Se ha encontrado una diferencia significativa al examinar las amplitudes de la posthiperpolarización media y la duración de las mAHP según patrón de disparo (ver sección 4.1.2). El análisis de subgrupos demuestra diferencias entre los valores de mAHP en neuronas que presentan descargas fásicas y tónicas; no así al comparar neuronas con descargas únicas y tónicas. Las diferencias parecen estar relacionadas con el tamaño de la muestra (número de células que exhiben un patrón de disparo tónico ( $n=3$ )), más que a una mayor densidad y/o distribución de canales que gobiernan la mAHP ( $I_M$  y/o  $I_C$ ) en las neuronas fásicas estudiadas.

En este estudio el 43,6% de las neuronas registradas presentan actividad espontánea. Específicamente las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo debido al conjunto y distribución de conductancias la actividad espontánea puede presentarse tanto como descargas únicas o en forma de ráfagas (Cohen y Miles, 2000). Como se mencionó anteriormente y se puede observar en la figura la 4.6, el disparo en ráfaga se caracteriza por comprender un tiempo corto donde hay una elevada frecuencia de disparos sobre una onda despolarizante y un periodo de inactividad posterior. Este tipo de comportamiento es más frecuente en algunos tipos de neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo como: células con elevada integridad

sináptica, neuronas localizadas más cerca de CA2 y aquellas cuyo soma se encuentra más próximo al estrato oriens. Ya que presentan una longitud inicial de su dendrita apical mayor donde consistentemente se agrupa una alta densidad de canales de calcio tipo L (Bilkey y Schwartzkroin, 1990; Jensen y Yaari, 1997).

El 29,1% de los casos la actividad espontánea se manifiesta en forma de ráfaga, generadas por efecto de una marcada postdespolarización (ADP) que sigue al potencial de acción capaz de desencadenar disparos posteriores (Wong y Prince, 1981). Y al igual que los resultados obtenidos por Hemond y cols (2008) los pulsos de corriente despolarizante utilizados durante la caracterización neuronal no generan disparos en forma de ráfaga lo cual alude a la importancia tanto de las sinapsis como estructuras dinámicas que gobiernan y modulan el flujo de información (Colino y cols, 2002) como de las propiedades celulares intrínsecas en este tipo de descarga.

### 5.1.3 CURVAS CORRIENTE - VOLTAJE

La morfología general de las curvas de corriente - voltaje encontradas para las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo se asemejan a las descritas por Dégenères y cols (2002) al analizar las propiedades electrofisiológicas de las neuronas piramidales en la corteza prefrontal de la rata y a las enunciadas por Mena (1996) en su análisis de las propiedades electrofisiológicas y morfológicas de la capa III de neuronas piramidales de la corteza entorrinal de la rata.

Los desplazamientos de la linealidad observados en los extremos conforme aumenta la amplitud de los pulsos aplicados evidencian que la resistencia de la membrana de las células en cuestión presenta un comportamiento dependiente de voltaje. Así el alejamiento de la linealidad observado al acercar el pulso de corriente despolarizante al valor de la reobase, fue descrito por primera vez en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo por Hotson y cols (1979) es producto de la activación de corrientes de entrada de sodio o calcio dependientes de voltaje en respuesta a la despolarización de la membrana, las cuales aumentan la respuesta al pulso aplicado; y se ve favorecido con la adición de sustancias como el bario que promueven la despolarización celular. Debido a que los canales que regulan dichas corrientes son sensibles a TTX este alejamiento puede rectificarse agregando TTX al medio. (Catterall, 2000; Lamas, 2005).

El alejamiento del comportamiento lineal del extremo izquierdo de las curvas de corriente contra voltaje se debe principalmente a la activación de canales catiónicos regulados por hiperpolarización. Específicamente para las neuronas piramidales de las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo cobra importancia la activación de canales que regulan la corriente  $I_h$  (*hyperpolarization-activated*), aunque con variaciones importantes según la región en cuestión (Lamas y cols, 2002; Hemond y cols, 2009). La  $I_h$  es una corriente catiónica mixta, regulada por canales de potasio dependientes de voltaje denominados HCN (*Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated*) también llamados rectificadores anómalos que son modulados por AMPc y permeables tanto a sodio como a potasio (Biel y cols, 2009).

En neuronas hipocampales estas corrientes están parcialmente activas desde los -60mV generando una ligera corriente de entrada (despolarizante) en reposo por lo que juegan un papel determinante en la determinación del potencial de membrana en reposo y de la conductancia de la membrana (Lüthi y McCormick, 1998). El incremento en la activación de estos canales favorece una despolarización y se produce conforme aumenta la hiperpolarización (Lamas, 2005) como se observa en la figura 4.8. Sin embargo, está descrito que en curvas de corriente - voltaje se evidencia de forma más pronunciada el desplazamiento de la linealidad a valores cercanos al potencial de equilibrio del potasio (Spruston y Johnston, 1992). Desplazamiento que puede ser eliminado agregando bloqueantes de la  $I_h$  como cesio (2–5 mM) o ZD7288 (30-100  $\mu$ M) (Spruston y McBain, 2007).

Como se mencionó en la sección 4.1.3 (ver sección de *Resultados*) y en forma similar a los resultados descritos por López-García y King (1994) y Dégenètaris y cols (2002) a pesar de las variaciones en los patrones de disparo analizadas previamente no se observan diferencias en las curvas de corriente-voltaje según el patrón de disparo, ya que en los tres tipos se observan desplazamientos en la linealidad.

Sin embargo y a diferencia de los resultados obtenidos por Mena (1996) y Dégenètaris y cols (2002) en sus investigaciones, en ningún caso previo a la adición de TTX la inyección de corriente hiperpolarizante generó potenciales de acción al rebote. Con las mismas magnitudes de corriente en la capa III de neuronas piramidales de la corteza entorrinal es frecuente la presencia de potenciales de acción al rebote; sin embargo con corrientes hiperpolarizantes de mayor magnitud sólo generan potenciales de acción al rebote en dos de los tres tipos celulares en neuronas piramidales en la corteza prefrontal de la rata, las discrepancias encontradas entre estudios sugieren estar en relación con diferencias en las características propias de las neuronas

piramidales según la región y una menor dependencia con las variaciones en la magnitud de los pulsos utilizados.

## 5.2 ESTUDIO FARMACOLÓGICO.

Los efectos del péptido amiloide sobre las propiedades de la membrana neuronal descritos en diversas publicaciones son múltiples y no siempre coincidentes (Ashenafi y cols, 2005; Yun y cols, 2006; Shankar y cols, 2007; Nimmrich y cols, 2008; Sepulveda y cols, 2010). Las discrepancias pueden obedecer a las condiciones propias de los procedimientos experimentales como por ejemplo: tipo de péptido amiloide utilizado, la concentración utilizada, el tiempo de exposición, la forma de administración, el tejido de experimentación y técnica entre otros. Varios autores han descrito que el péptido amiloide genera una despolarización (Blanchard y cols, 2002; Kidd y Sattelle, 2006; Zou y cols, 2011). De forma similar resultados obtenidos en trabajos anteriores demuestran que la administración aguda de  $\beta$  – amiloide (25-35) como monómero en concentraciones de 1 $\mu$ M a neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo favorece la despolarización celular y el aumento en la resistencia de entrada. Ambos efectos, despolarización y aumento de la resistencia de entrada son consistentes con nuestros resultados y punto de partida en el presente trabajo.

### 5.2.1 UTILIZACIÓN DE ANTAGONISTAS MUSCARÍNICOS

Con el objetivo de minimizar el efecto de la activación de otras vías de señalización sobre los resultados obtenidos, como puede observarse en las figuras 4.9, 4.10, 4.11 y 4.12 (ver sección de *Resultados*) previo a la adición del antagonista muscarínico hemos perfundido con CNQX (10 $\mu$ M), APV (50 $\mu$ M) y/o TTX (1 $\mu$ M) (Spruston y McBain, 2007; Prat y cols, 2009).

La perfusión con CNQX como antagonista competitivo de los receptores de glutamato de tipo AMPA/Kainato (Watkins y cols, 1990) y APV como antagonista específico de los receptores de glutamato de tipo NMDA (Hara y cols, 1997) validan que la respuesta observada es independiente de la activación de receptores ionotrópicos de glutamato (Salter y Kalia, 2004; Haitin y Attali, 2008). La toxina TTX bloquea selectivamente, de forma reversible, canales de

sodio dependientes de voltaje, mecanismo que bloquea la transmisión nerviosa ya que impide la generación de respuestas postsinápticas (Roy y Narahashi, 1992). Como se puede observar en las figuras 4.14, 4.18 y 4.20 (ver sección de *Resultados*) el bloqueo de canales de sodio sensibles a TTX (TTX-s) origina un aumento en la resistencia de entrada de la célula. Aspecto descrito por otros autores (Echegoyen y cols, 2007; Pinto y cols, 2008).

La perfusión con los antagonistas muscarínicos tanto no selectivos como selectivos para M1 genera en la mayoría de los casos una ligera hiperpolarización poco visible en nuestros registros (ver figura 4.9), ya que se compensa mediante la inyección de corriente con el fin de mantener el valor del potencial de membrana lo más cercano a su valor de reposo y poder determinar de forma más fiable el cambio en la resistencia de entrada (Gu y cols, 2005).

En las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo registradas se observa que tanto la atropina como la pirenzepina originan una disminución en la magnitud de la respuesta hiperpolarizante generada por la aplicación del pulso de corriente constante (ver figuras 4.9 y 4.11). Este resultado, al igual que describen Delmas y Brown (2005) (ver figura 5.1) podría estar generado por la apertura de los canales KCNQ que median la  $I_M$ . La apertura de estos canales explicaría la disminución observada en la resistencia de entrada (ver figuras 4.10 y 4.12).

Es importante notar que al comparar la disminución en la amplitud de la respuesta por la aplicación del pulso hiperpolarizante y/o el descenso en la resistencia de entrada de las células representadas en las figuras 4.9 a 4.12 se observan efectos más destacables para la pirenzepina que para la atropina. Diferencias que se mantienen constantes entre antagonistas M1 selectivos y no selectivos (ver tabla 4.2 y figura 5.1). Esta diferencia dependiente del tipo de bloqueante podría relacionarse con una mayor constante de afinidad hacia los receptores muscarínicos de tipo M1 por parte de la pirenzepina (Caulfield y Birdsall, 1998) y a un efecto más indiscriminado del antagonista no selectivo sobre otras conductancias donde el receptor muscarínico implicado no sea de tipo M1 (Guérineau y cols, 1995; Guérineau y cols, 1997). Sin embargo la comparación de los valores de RER para el S1 entre antagonistas selectivos y no selectivos confirma que las diferencias observadas no son estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

Como se puede observar en las figuras 4.9 y 4.11 tanto en presencia de atropina como de pirenzepina la perfusión con el péptido amiloide (25-35) genera un incremento en la amplitud de la respuesta al pulso de corriente hiperpolarizante. Mientras en las figuras 4.10 y 4.12 se observa que la perfusión con el péptido amiloide genera un incremento mayor en la resistencia

de entrada para la pirenzepina que para la atropina. Sin embargo el análisis de la varianza de los cambios en la resistencia de entrada en presencia de  $\beta$  – amiloide indica la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (ver sección 4.2.7 de *Resultados*).

Ya que la perfusión con atropina y/o pirenzepina bloquea los receptores muscarínicos tipo M1, M3 y M5; y/o M2, M4 implica que el efecto del péptido  $\beta$  – amiloide no puede estar mediado a través de estos receptores por estar ocupados por el antagonista. Por tanto, debemos considerar la posibilidad de que el  $\beta$  – amiloide esté afectando la conductancia de la membrana por acción sobre otros puntos de la vía de señalización, otros receptores y/o distintos canales.

## 5.2.2 APLICACIÓN DE AGONISTAS MUSCARÍNICOS

Conforme a nuestro protocolo experimental, la perfusión previa a la aplicación de agonistas muscarínicos con CNQX, APV y TTX permite aislar funcionalmente la célula, pudiéndose considerar que los efectos generados por el fármaco o droga son directos sobre la conductancia de la neurona registrada (ver figura 5.1) (Roy y Narahashi, 1992; Prat y cols, 2009).

En los protocolos en que se utilizan agonistas como muscarina y carbacol se incorpora además al medio M – caconitina (ver figuras 4.13 y 4.14). La metillicaconitina es un antagonista específico del receptor nicotínico de acetilcolina tanto a nivel nervioso como muscular (Marchi y cols., 2002) capaz de bloquear corrientes iónicas mediadas por este receptor en las neuronas del hipocampo (Alkondon y cols, 1992).

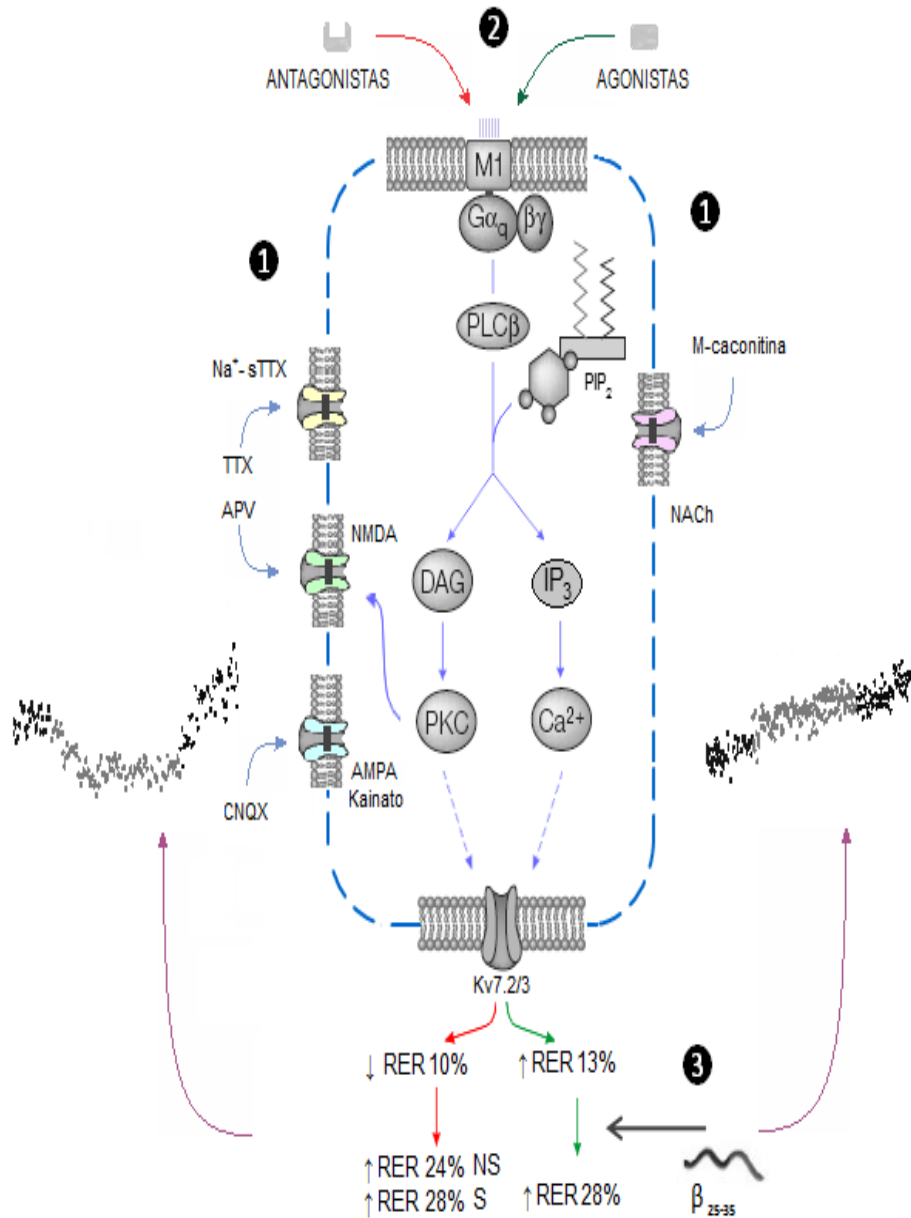
En las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo analizadas la presencia del agonista muscarínico en el medio genera una ligera despolarización celular que se compensa mediante la inyección de corriente sin embargo esta variación en el potencial de reposo es menos evidente si se compara con la hiperpolarización contemplada durante el empleo de antagonistas muscarínicos.

La adición de agonistas muscarínicos origina un aumento en la amplitud de la respuesta al pulso de corriente hiperpolarizante (ver figuras 4.13 y 4.15) y una elevación en la resistencia de entrada (ver figuras 4.14 y 4.16). No hemos encontrado diferencias dependiendo del tipo de agonista utilizado ni de la concentración utilizada. Resultados semejantes con los descritos por Storm (1990), Delmas y Brown (2005) y Gu y cols (2005) y sugerentes de un cierre canales KCNQ que gobiernan la  $I_M$  por activación de receptores muscarínicos M1.

En las figuras 4.13, 4.14, 4.15 y 4.16 se observa que en estas condiciones la perfusión con péptido amiloide (25-35) generan un aumento en amplitud de la respuesta a pulsos hiperpolarizantes y una elevación de la resistencia de entrada. La comparación estadística de los valores de la resistencia de entrada relativa calculados en presencia del péptido amiloide (25-35) y los distintos agonistas no revelan de diferencias significativas. Tampoco se observan diferencias entre agonistas y antagonistas (ver sección 4.2.7 de *Resultados*).

Como demuestran nuestros resultados, la activación del receptor muscarínico utilizando carbacol o muscarina genera un aumento en la resistencia de la membrana que sería la consecuencia de la afectación (cierre) de los canales KCNQ. Puesto que la aplicación del agonista es de forma continua, los receptores se encontrarían ocupados y los canales KCNQ en condiciones de baja conductancia. El hecho de que la perfusión con el péptido amiloide genere un mayor incremento en la resistencia de la membrana, descarta su efecto sobre los receptores.





**Figura 5.1 Efecto del péptido  $\beta$  - amiloide  $_{(25-35)}$  sobre la resistencia de entrada de neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo al utilizar antagonistas o agonistas muscarínicos del tipo M1.** M1: receptor muscarínico subtipo M1 donde se evidencian los segmentos transmembrana,  $G_{\alpha_q} \beta \gamma$ : proteína G trimérica acoplada a receptor muscarínico, PLC  $\beta$ : fosfolipasa C  $\beta$ ,  $PIP_2$ : fosfatidilinositol-4,5- bifosfato, DAG diacilglicerol,  $IP_3$ : inositol trifosfato, PKC: proteína quinasa C,  $Ca^{2+}$ : ión calcio,  $Kv7.2/3$ : canal de potasio dependiente de voltaje células piramidales de la región CA3 del hipocampo, RER: resistencia de entrada relativa, NS: antagonista muscarínico no selectivo, S: antagonista muscarínico selectivo,  $\beta_{25-35}$ : péptido amiloide, TTX: tetrodotoxina,  $Na^+$  s-TTX: canales de sodio dependientes de voltaje sensibles a TTX, NMDA: receptor de glutamato tipo NMDA, AMPA/kainato: receptor de glutamato tipo AMPA/kainato, APV: antagonista específico de los receptores de glutamato de tipo NMDA, CNQX: antagonista competitivo de los receptores de glutamato tipo AMPA/kainato, NACH: receptor nicotínico neuronal de acetilcolina, M-caconitina: bloqueante de los receptores colinérgicos nicotínicos.

Puesto que el efecto del péptido amiloide <sup>(25-35)</sup> como monómero sobre la resistencia de entrada de neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo no se ve alterado de forma sustancial por la acción de antagonistas no selectivos, antagonistas selectivos, agonistas no selectivos ni agonistas selectivos de los receptores muscarínicos de acetilcolina; se sugiere que el efecto del mismo no está mediado por una acción directa sobre el receptor y que debe involucrar otros componentes de la vía muscarínica o vías de señalización distintas.

### 5.2.3 UTILIZACIÓN DE INHIBIDORES DE LA PROTEÍNA QUINASA C

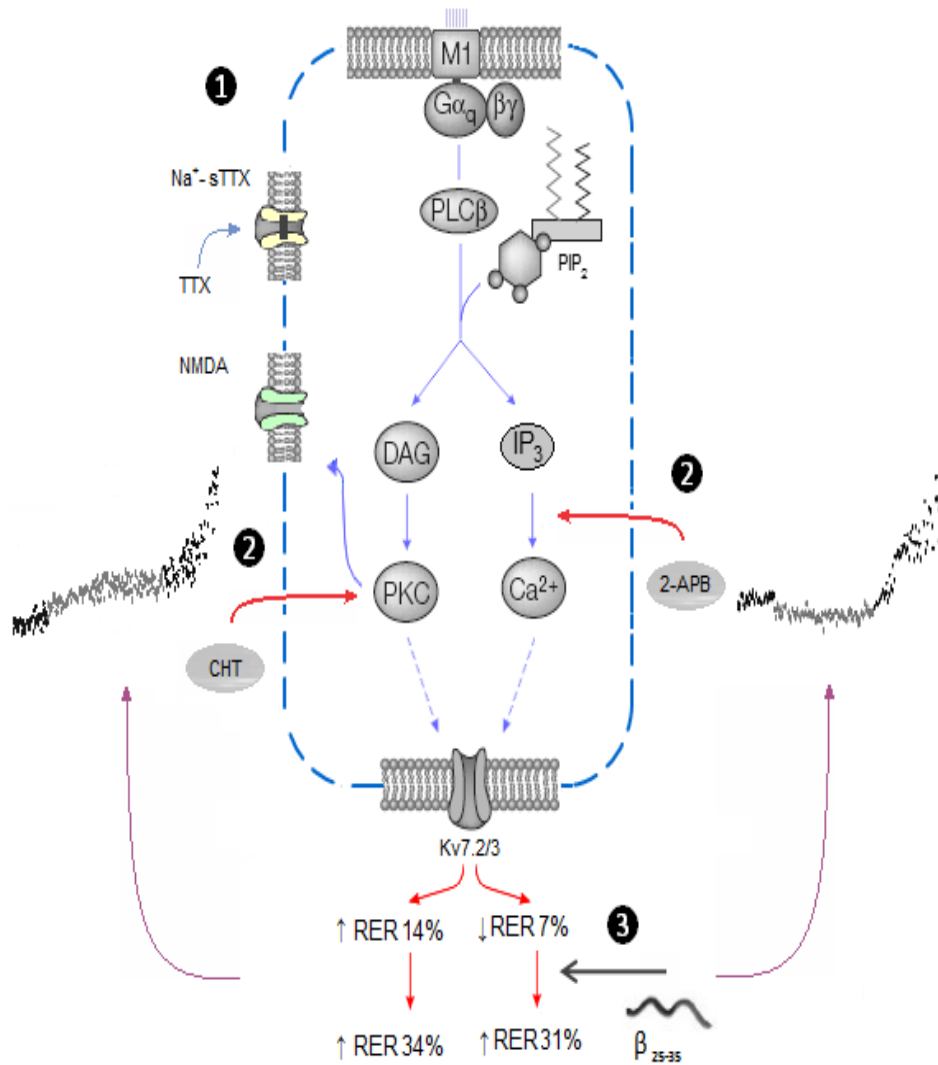
En las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo analizadas no se observan variaciones importantes en los valores del potencial de membrana en reposo tras la perfusión con chelerytrine (ver sección 4.2.4 de *Resultados*), inhibidor de la actividad de la proteína quinasa C que requieran la inyección de corriente. Sin embargo, en presencia de esta droga el pulso hiperpolarizante genera un incremento en la respuesta respecto a la situación control, así como en los valores de la resistencia de entrada relativa (tabla 4.2 y figuras 4.17 y 4.18). Este efecto no puede atribuirse a una acción del entorno neuronal ya que previo a la adición de chelerytrine se perfundió con TTX (ver figura 5.2), para bloquear la transmisión nerviosa a través del bloqueo de los canales de sodio dependientes de voltaje (Roy y Narahashi, 1992). Dado que la proteína quinasa C participa en varias vías de señalización y puede producir fosforilaciones en distintos sistemas y canales iónicos, este aumento en la resistencia de entrada podría estar más relacionado a un efecto indirecto sobre determinadas conductancias producto de la inhibición de la actividad basal de la misma (Astman y cols, 1998; Franceschetti y cols, 2000).

Nuestros resultados muestran que en las células previamente tratadas con chelerytrine la presencia aguda de  $\beta$  – amiloide <sup>(25-35)</sup> (ver figuras 4.17, 4.18 y sección 4.2.7 de *Resultados*) genera un aumento en el valor de resistencia de entrada relativa para el estadio S2 (ver tabla 4.2). Este resultado sugiere que el efecto del péptido amiloide <sup>(25-35)</sup> sobre la resistencia de entrada en este tipo de neuronal no está mediado por una acción directa sobre la proteína quinasa C e involucra otros componentes de la vía muscarínica u otras vías de señalización.

#### 5.2.4 UTILIZACIÓN DE ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR INTRACELULAR DE INOSITOL TRIFOSFATO (IP3)

Como se mencionó en la sección 3.3 (ver *Introducción*) el cambio de voltaje es el responsable fundamental de la actividad de los canales que regulan la corriente M (Haitin y Attali, 2008). Asimismo la liberación del calcio intracelular almacenado a nivel de retículo endoplasmático y mediada por inositol trifosfato constituye el principal mecanismo para favorecer el cierre de los canales de potasio dependientes de voltaje KCNQ. Por lo que la utilización de un inhibidor del receptor de inositol trifosfato deprime la liberación de calcio intracelular, produce una disminución en la concentración citoplasmática del mismo y reduce el efecto modulador del ion sobre el receptor (Delmas y Brown, 2005). Del mismo modo una disminución en la concentración basal de calcio sería la responsable del cierre de una menor cantidad de canales KCNQ, este efecto sería el responsable del descenso en la resistencia de entrada de las células piramidales de la región CA3 del hipocampo estudiadas (ver figuras 4.19, 4.20 y 5.2).

En las figuras 4.19 y 4.20 se aprecia como la acción del péptido amiloide (25-35) sobre neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo tratadas previamente con un antagonista del receptor de IP3 permeable por la membrana citoplasmática presenta modificaciones en sus propiedades electrofisiológicas semejantes a las observadas en todos los casos anteriores. El péptido genera un incremento en la magnitud del cambio al pulso hiperpolarizante y una elevación de la resistencia de entrada. Asimismo el análisis de las variaciones en la resistencia de entrada relativa en presencia de  $\beta$  – amiloide indica la ausencia de discrepancias estadísticamente significativas entre grupos. Este resultado sugiere que el efecto agudo del  $\beta$  – amiloide (25-35) sobre la resistencia de entrada neuronal no involucra directamente la liberación intracelular de calcio vía receptor de inositol trifosfato.



**Figura 5.2 Efecto del péptido  $\beta$  - amiloide (25-35) sobre la resistencia de entrada de neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo al utilizar inhibidores de la proteína quinasa C e inhibidores del receptor de IP<sub>3</sub>.** M1: receptor muscarínico subtipo M1 donde se evidencian los segmentos transmembrana, Gαq βγ: proteína G trimérica acoplada a receptor muscarínico, PLC β: fosfolipasa C β, PIP<sub>2</sub>: fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato, DAG diacilglicerol, IP<sub>3</sub>: inositol trifosfato, PKC: proteína quinasa C, Ca<sup>2+</sup>: ión calcio, Kv7.2/3: canal de potasio dependiente de voltaje células piramidales de la región CA3 del hipocampo, RER: resistencia de entrada relativa, β<sub>25-35</sub>: péptido amiloide, TTX: tetrodotoxina, Na<sup>+</sup> s-TTX: canales de sodio dependientes de voltaje sensibles a TTX, NMDA: receptor de glutamato tipo NMDA, CHT: chelerytrine como inhibidor de la PKC, 2-APB: 2-aminoetoxi-difenilborato como antagonista del receptor de IP<sub>3</sub>.

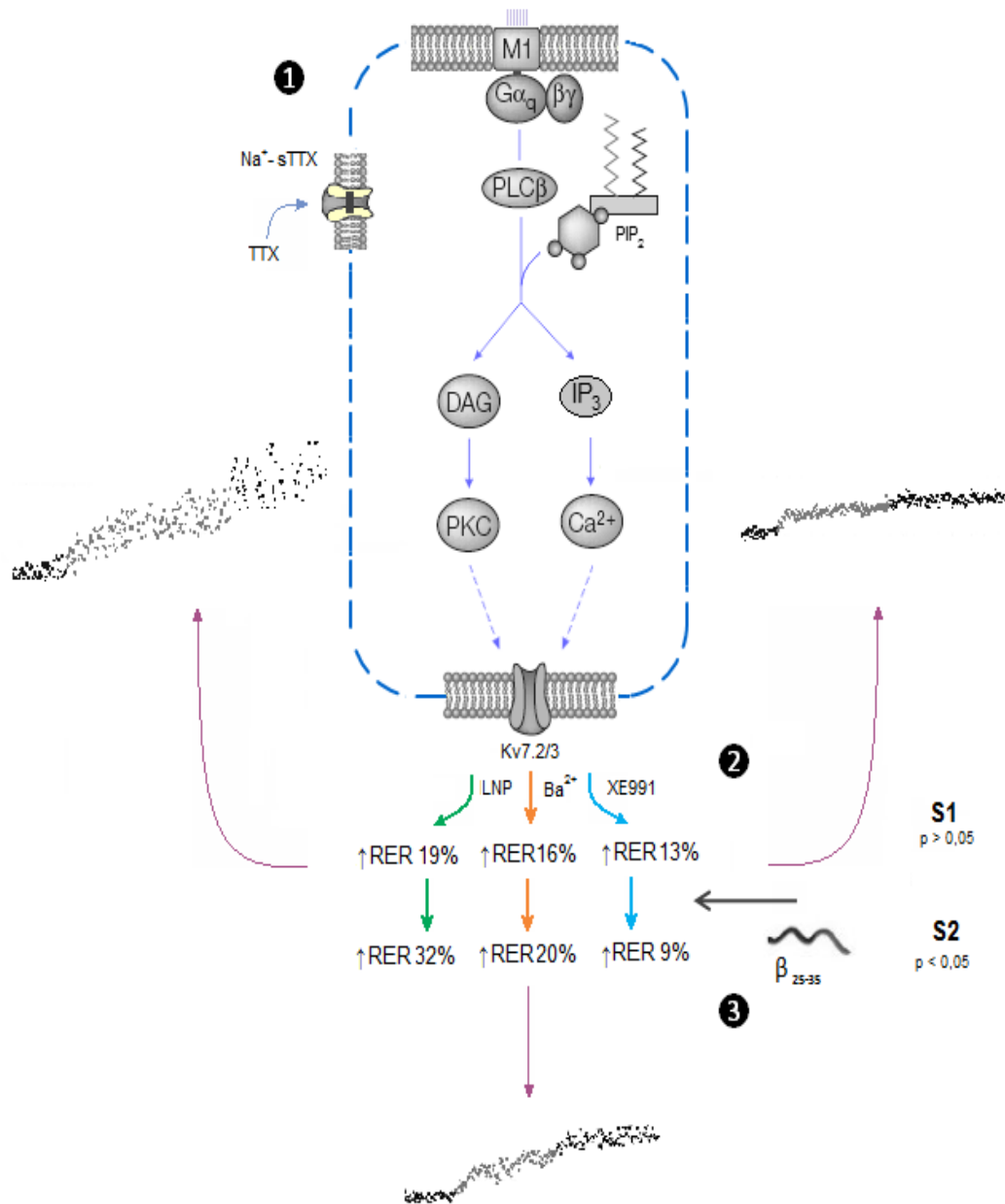
### 5.2.5 UTILIZACIÓN BLOQUEANTES DE CANALES DE POTASIO

La despolarización y el aumento en la resistencia de entrada observados previo a la adición del  $\beta$  – amiloide <sup>(25-35)</sup> en todas las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo sometidas a este protocolo puede ser explicado por un efecto de bloqueo de los canales de potasio dependientes de voltaje tipo KCNQ y el consecuente aumento intracelular de cargas positivas (Delmas y Brown, 2005). La evaluación del efecto sobre los valores de la resistencia de entrada relativa con los distintos tipos de bloqueantes KCNQ en ausencia del péptido amiloide (estadio S1) demuestra que la diferencia entre grupos no es estadísticamente significativa (ver tabla 4.2 y figura 5.3).

De forma similar a los resultados encontrados durante la utilización de agonistas muscarínicos, las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo de rata tratadas previamente con linopiridina presentan tras la perfusión con  $\beta$  – amiloide <sup>(25-35)</sup> un aumento en la respuesta al pulso hiperpolarizante (ver figura 4.21) y una elevación de la resistencia de entrada (ver figura 4.22). Sin embargo, no existen diferencias significativas al analizar los valores de la resistencia de entrada relativa en presencia de péptido amiloide (S2) entre los grupos 1 a 6 (ver tabla 4.2).

Como se puede observar en las figuras 4.23 y 4.24 el XE991 incrementa tanto la amplitud de la respuesta por la aplicación del pulso hiperpolarizante como la resistencia de entrada de las células piramidales de la región CA3 del hipocampo de la rata. Al igual que en el caso anterior este cambio en las propiedades electrofisiológicas se debe al bloqueo de los canales de potasio KCNQ, puesto que este compuesto a las concentraciones utilizadas en la presente investigación inhibe de forma selectiva la corriente M (Leão y cols, 2009).

En nuestros resultados las diferencias encontradas en los valores de la resistencia de entrada relativa para el estadio S1 con XE991, linopiridina o bario (ver figura 5.3), no son significativas.



**Figura 5.3 Efecto del péptido  $\beta$  - amiloide (25-35) sobre la resistencia de entrada de neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo al utilizar bloqueantes del canal de potasio KCNQ.**  
M1: receptor muscarínico subtipo M1 donde se evidencian los segmentos transmembrana,  $G_{\alpha q} \beta \gamma$ : proteína G trimérica acoplada a receptor muscarínico, PLC  $\beta$ : fosfolipasa C  $\beta$ , PIP<sub>2</sub>: fosfatidilinositol-4,5- bifosfato, DAG diacilglicerol, IP<sub>3</sub>: inositol trifosfato, PKC: proteína quinasa C,  $Ca^{2+}$ : ión calcio, Kv7.2/3: canal de potasio dependiente de voltaje células piramidales de la región CA3 del hipocampo, RER: resistencia de entrada relativa,  $\beta_{25-35}$ : péptido amiloide, TTX: tetrodotoxina,  $Na^+$ -s-TTX: canales de sodio dependientes de voltaje sensibles a TTX, LNP: linopiridina,  $Ba^{2+}$ : ion bario, XE991: bloqueante potente de los canales KCNQ.

En las figuras 4.25 y 4.26 se pone de manifiesto que las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo de la rata tratadas con bario (3mM) como bloqueante no selectivo de los canales de potasio dependientes de voltaje tipo KCNQ (Cotton, 2000; Jiang y MacKinnon, 2000; Alagem y cols, 2001) en presencia de TTX (1 $\mu$ M), muestran un comportamiento intermedio para el estadio S1 si se compara con los resultados obtenidos con linopiridina y XE991. A pesar que el análisis estadístico no evidencia diferencias significativas entre grupos para el estadio S1.

La inclusión en el análisis de cambios en la resistencia de entrada relativa en presencia del péptido amiloide (S2); de los resultados de las células piramidales tratadas con XE991 ó bario con los otros grupos evidencia la presencia de diferencias significativas. Diferencias presentes tanto entre los primeros seis grupos y las neuronas tratadas con XE991 ó bario, como entre los dos últimos grupos. Del mismo modo el contraste de medias de la resistencia de entrada relativa en el estadio S2 para las células perfundidas con XE991 ó bario establece la existencia de diferencias a un nivel de significancia del 95%.

Los resultados anteriormente expuestos demuestran que distintos bloqueantes del canal de potasio dependiente de voltaje tipo KCNQ producen disminuciones variables en la magnitud del incremento de la resistencia de entrada que produce la perfusión con el péptido amiloide (25-35). Las diferencias en esta reducción estarían estrechamente relacionadas con las propiedades del bloqueante utilizado (selectividad, eficacia, dependencia de voltaje) y de las subunidades que componen el canal. Ya que conforme han descrito otros autores, la linopiridina a la concentración utilizada en nuestro trabajo bloquea principalmente los canales conformados por las subunidades KCNQ2 y KCNQ3; mientras que el XE991 afecta a los tipo KCNQ1 y KCNQ2. Por otro lado el cloruro de bario solamente afecta aproximadamente al 50% de los canales KCNQ expresados en las células nerviosas (Zaczek y cols, 1998; Wang y cols, 2000; Romero y cols, 2004; Elmedy y cols, 2007; Miceli y cols, 2008). Esta disparidad en la eficacia del bloqueante en función del tipo de canal podría justificar las diferencias encontradas en sus efectos sobre la resistencia de entrada.

Este estudio demuestra que el aumento en la resistencia de entrada en las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo de la rata producto de la acción aguda del  $\beta$  - amiloide (25-35) monomérico no se restringe en presencia de antagonistas muscarínicos no

selectivos, antagonistas M1 selectivos, agonistas muscarínicos no selectivos, agonistas M1 selectivos, inhibidores de la proteína quinasa C ni de inhibidores del receptor de IP3. Pero si se produce cuando se bloquea previamente los canales de potasio dependientes de voltaje tipo KCNQ con XE991 y bario. Este resultado sugiere que el efecto del péptido amiloide (25-35) sobre la resistencia de entrada neuronal está mediado por una acción directa sobre el canal KCNQ y que los otros componentes de la vía de señalización muscarínica mencionados poseen escasa intervención en el efecto observado.



## **6. CONCLUSIONES**

- ◆ Ante un mismo estímulo las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo de rata pueden presentar distintos patrones de disparo ya sea en forma de descarga única, fásica o de adaptación lenta, este resultado sugiere distintas propiedades intrínsecas en su membrana citoplasmática.
- ◆ Las curvas de corriente voltaje en las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo independientemente del patrón de disparo exhibido presentan un comportamiento lineal sin aparentes rectificaciones a los valores fisiológicos de voltaje.
- ◆ El efecto agudo del péptido amiloide <sup>(25-35)</sup> como monómero sobre la resistencia de entrada de neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo no está mediado por una acción directa sobre los receptores muscarínicos de acetilcolina.
- ◆ El aumento en la resistencia de entrada de neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo provocado por la administración aguda del péptido amiloide <sup>(25-35)</sup> monomérico no se debe a un efecto directo sobre la proteína quinasa C.
- ◆ La utilización de 2-APB como antagonista del receptor intracelular de inositol trifosfato en células piramidales de la región CA3 del hipocampo no modifica el aumento en la resistencia de entrada observadas a consecuencia de la perfusión con el péptido  $\beta$  - amiloide <sup>(25-35)</sup>.
- ◆ El aumento en la resistencia de entrada de neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo de la rata resultante de la administración aguda de  $\beta$  – amiloide <sup>(25-35)</sup> disminuye de forma variable con la utilización de bloqueantes del canal de potasio dependiente de voltaje tipo KCNQ.

- ◆ El incremento de la resistencia de entrada de las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo de la rata por efecto de la perfusión ( 5 a 30 minutos) con péptido  $\beta$ -amiloide<sub>(25-35)</sub> monomérico es atribuible a un efecto directo sobre los canales KCNQ.

## **7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- [1] Abriel, H., Staub, O. 2005. Ubiquitylation of ion channels. *Physiology (Bethesda)*, 20 : 398 - 407.
- [2] Adams, P. R., Brown, D. A., Constanti, A. 1982. Pharmacological inhibition of the M-current. *J. Physiol.*, 332 : 223 - 262.
- [3] Adlard, P.A., Perreau, V.M., Pop, V., Cotman, C.W. 2005. Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.*, 25 : 4217 – 4221.
- [4] Ahn, K. J., Jeong, H. K., Choi, H. S., Ryoo, S. R., Kim, Y. J., Goo, J. S., Choi, S. Y., Han, J. S., Ha, I., Song, W. J. 2006. DYRK1A BAC transgenic mice show altered synaptic plasticity with learning and memory defects. *Neurobiol. Dis.*, 22: 463 - 472.
- [5] Aiken, S.P., Lampe, B.J., Murphy, P.A., Brown, B.S. 1995. Reduction of spike frequency adaptation and blockade of M-current in rat CA1 pyramidal neurones by linopirdine (DuP 996), a neurotransmitter release enhancer. *Br. J. Pharmacol.*, 115 (7) : 1163 - 1168.
- [6] Aisen, P. S. Saumier, D., Briand, R., Laurin, J., Gervais, F., Tremblay, P., Garceau, D. 2006. A Phase II study targeting amyloid –  $\beta$  with 3APS in mild - to - moderate Alzheimer disease. *Neurology*, 67 (2) : 1757 – 1763.
- [7] Aisen, P. S. 2009. Alzheimer's disease therapeutic research: the path forward. *Alzheimers Res. Ther.*, 1 (1): 1 – 6.
- [8] Alagem, N., Dvir, M., Reuveny, E. 2001. Mechanism of  $Ba^{2+}$  block of a mouse inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel: differential contribution by two discrete residues. *J. Physiol.*, 534 (Pt. 2) : 381 - 393.
- [9] Albuquerque, E.X., Santos, M.D., Alkondon, M., Pereira, E. F., Maelicke, A. 2001. Modulation of Nicotinic Receptor Activity in the Central Nervous System: A Novel Approach to the Treatment of Alzheimer Disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, 15 (1) : S19 – S25.
- [10] Albuquerque, E.X., Pereira, E.F., Alkondon, M., Rogers, S.W. 2009. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.*, 89 (1) : 73 - 120.
- [11] Alkondon, M., Pereira, E.F., Wonnacott, S., Albuquerque, E.X. 1992. Blockade of nicotinic currents in hippocampal neurons defines methyllycaconitine as a potent and specific receptor antagonist. *Mol. Pharmacol.*, 41 (4) : 802 - 808.
- [12] Alonso-Nanclares, L., White, E.L., Elston, G.N., DeFelipe, J. 2004. Synaptology of the proximal segment of pyramidal cell basal dendrites. *Eur. J. Neurosci.*, 19 (3) : 771 - 776.
- [13] Álvarez-Sabín, J., Román, G.C. 2011. Citicolina in Vascular Cognitive Impairment and Vascular Dementia After Stroke. *Stroke*, 42 : S40 - S43.
- [14] Alvarado, J.C. 2001. Génesis de la señal de posición ocular en el núcleo prepositus hypoglossi. [Tesis Doctoral] Sevilla, España.

- [15] Alzheimer, A. 1907. Über einen eigenartigen schweren Krankheitsprozess der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin*, 64 : 146-148.
- [16] Amaral, D., Lavenex, P. 2007. Hipocampal Neuroanatomy. En: Andersen, P. y cols. eds. *The Hippocampus Book*. Manhattan. p 36 - 114.
- [17] Amor, S., Puentes, F., Baker, D., van der Valk, P. 2010. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology*, 129 (2) : 154 - 169.
- [18] Araya, R, Noguchi, T., Yuhki, M., Kitamura, N., Higuchi, M., Saido, T.C., Seki, K., Itohara, S., Kawano, M., Tanemura, K., Takashima, A., Yamada, K., Kondoh, Y., Kanno, I., Wess, J., Yamada, M. 2006. Loss of M5 muscarinic acetylcholine receptors leads to cerebrovascular and neuronal abnormalities and cognitive deficits in mice. *Neurobiol. Dis.*, 24 (2) : 334 - 344.
- [19] Arneric, S. P., Holladay, M., Williams, M. 2007. Neuronal nicotinic receptors: a perspective on two decades of drug discovery research. *Biochem. Pharmacol.*, 74: 1092 – 1101.
- [20] Ashenafi, A. S. 2004. Neurotransmisión en el Complejo basolateral Amigdalino: Efectos del Péptido  $\beta$ - Amiloide (25- 35) [Tesis Doctoral] Salamanca, España.
- [21] Ashenafi, S., Fuente, A., Criado, J.M., Riobobos, A.S., Heredia, M., Yajeya, J. 2005. Beta-Amyloid peptide 25-35 depresses excitatory synaptic transmission in the rat basolateral amygdala "in vitro". *Neurobiol. Aging*, 26 (4) : 419 - 428.
- [22] Astman, N., Gutnick, M.J., Fleidervish, I.A. 1998. Activation of protein kinase C increases neuronal excitability by regulating persistent Na<sup>+</sup> current in mouse neocortical slices. *J. Neurophysiol.*, 80 (3) : 1547 - 1551.
- [23] Ávila, J., Hernández, F. 2007. GSK-3 inhibitors for Alzheimer's disease. *Expert Rev. Neurother.*, 7 : 1527 – 1533.
- [24] Avlani, V.A., Langmead, C.J., Guida, E., Wood, M.D., Tehan, B.G., Herdon, H.J., Watson, J.M., Sexton, P.M., Christopoulos, A. 2010. Orthosteric and allosteric modes of interaction of novel selective agonists of the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *Mol. Pharmacol.*, 78 (1) : 94 - 104.
- [25] Azouz, R., Alroy, G., Yaari, Y. 1997. Modulation of the endogenous firing patterns by osmolarity in rat hippocampal neurons. *J. Physiol.*, 502: 175 -187.
- [26] Bagriantsev, S., Liebman, S. 2006. Modulation of A $\beta$ 42 low-n oligomerization using a novel yeast reporter system. *BMC Biology*, 4 (32): 1 -12.
- [27] Bai, D., del Corosso, C., Srinivas, M., Spray, D.C. 2006. Block of specific gap junction channel subtypes by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 319 (3) : 1452 - 1458.

- [28] Baker, J.D., Lenz, R.A., Locke, C., Wesnes, K., Maruff, P., Abi-Saab, W.M., Saltarelli, M.D. 2009. ABT-089, a neuronal nicotinic receptor partial agonist, reverses scopolamine-induced cognitive deficits in healthy normal subjects. *Alzheimer Dement.*, 5 (4Suppl1) : S325.
- [29] Balaraman, Y., Limaye, A. R., Levey, A. I., Srinivasan, S. 2006. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  and Alzheimer's disease: pathophysiological and therapeutic significance. *Cell Mol. Life Sci.*, 63: 1226 - 1235.
- [30] Bales, K.R., Liu, F., Wu, S., Lin, S., Koger, D., DeLong, C., Hansen, J.C., Sullivan, P.M., Paul, S.M. 2009. Human APOE isoform-dependent effects on brain beta-amyloid levels in PDAPP transgenic mice. *J. Neurosci.*, 29 (21) : 6771-6779.
- [31] Bandyopadhyay, S., Goldstein, L.E., Lahiri, D.K., Rogers, J.T. 2007. Role of the APP non-amyloidogenic signaling pathway and targeting  $\alpha$ -secretase as an alternative drug target for treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.*, 14 : 2848 – 2864.
- [32] Ballatore, C., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q. 2007. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat. Rev. Neurosci.*, 8: 663 – 672.
- [33] Baumann, S., Höttecke, N., Schubengel, R., Baumann, K., Schmidt, B. 2009. NSAID-derived gamma-secretase modulators. Part III: Membrane anchoring. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19 (24) : 6986 -6990.
- [34] Baxter, E.W., Conway, K.A., Kennis, L., Bischoff, F., Mercken, M.H., Winter, H.L., Reynolds, C.H., Tongue, B.A., Luo, C., Scott, M.K., Huang, Y., Braeken, M., Pieters, S.M., Berthelot, D.J., Masure, S., Bruinzeel, W.D., Jordan, A.D., Parker, M.H., Boyd, R.E., Qu, J., Alexander, R.S., Brenneman, D.E., Reitz, A.B. 2007. "2-Amino-3,4-dihydroquinazolines as inhibitors of BACE-1 (beta-site APP cleaving enzyme): Use of structure based design to convert a micromolar hit into a nanomolar lead". *J. Med. Chem.*, 50 (18): 4261 – 4264.
- [35] Bear, M. F., Connors, B. W., Paradiso, M. A. 2006. The Limbic System Concept. En : Lippincott Williams & Wilkins eds Neuroscience: Exploring the Brain. Philadelphia. p 568 – 570.
- [36] Beck, J., Lenart, B., Kintner, D.B., Sun, D. 2003. Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> Cl<sup>-</sup> cotransporter contributes to glutamate-mediated excitotoxicity. *J. Neurosci.*, 23: 5061–5068.
- [37] Beel, A.J., Sakakura, M., Barrett, P.J., Sanders, C.R. 2010. Direct binding of cholesterol to the amyloid precursor protein: an important interaction in lipid-Alzheimer's disease relationships? *Biochim. Biophys. Acta*, 1801 (8): 975 – 982.
- [38] Benatar, M., 2000. Neurological potassium channelopathies. *Q. J. Med.*, 93: 787 - 797.
- [39] Bertram, L., Tanzi, R.E. 2008. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nat. Rev. Neurosci.*, 9 (10) :768 -778.

- [40] Best, J.D., Smith, D.W., Reilly, M.A., O'Donnell, R., Lewis, H.D., Ellis, S., Wilkie, N., Rosahl, T.W., Laroque, P.A., Boussiquet-Leroux, C., Churcher, I., Atack, J.R., Harrison, T., Shearman, M.S. 2007. The novel gamma secretase inhibitor N-[cis-4-[(4-chlorophenyl)sulfonyl]-4-(2,5-difluorophenyl)cyclohexyl]-1,1,1-trifluoromethanesulfonamide (MRK-560) reduces amyloid plaque deposition without evidence of notch-related pathology in the Tg2576 mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 320: 552 – 558.
- [41] Biel, M., Wahl-Schott, C., Michalakis, S., Zong, X. 2009. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev.*, 89 (3) : 847 - 885.
- [42] Bilkey, D.K., Schwartzkroin, P.A. 1990. Variation in electrophysiology and morphology of hippocampal CA3 pyramidal cells. *Brain Res.*, 514 (1) : 77 - 83.
- [43] Billings, L.M., Green, K.N., McGaugh, J.L., Laferla, F.M. 2007. Learning decreases A $\beta$ \*56 and tau pathology and ameliorates behavioral decline in 3xTg-AD mice. *J. Neurosci.*, 27 : 751 – 761.
- [44] Blackburn, G. M., Brown, W. D., Mirza, N.R., Mikkelsen, J.D., Munro, R.E. 2005. Retigabine: chemical synthesis to clinical application. *CNS Drug Rev.*, 11 : 1 – 20.
- [45] Blain, J.F., Poirier, J. 2004. Cholesterol homeostasis and the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Expert Rev. Neurother.*, 4: 823 – 829.
- [46] Blanchard, B.J., Thomas, V.L., Ingram, V.M. 2002. Mechanism of membrane depolarization caused by the Alzheimer A $\beta$ 1-42 peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 293 (4) : 1197 – 1203.
- [47] Blasko, I., Beer, R., Bigl, M., Apelt, J., Franz, G., Rudzki, D., Ransmayr, G., Kampfl, A., Schliebs, R. 2004. Experimental traumatic brain injury in rats stimulates the expression, production and activity of Alzheimer's disease  $\beta$ -secretase (BACE-1). *J. Neural. Transm.*, 111 : 523 – 536.
- [48] Blazer, L.L., Neubig, R.R. 2009. Small Molecule Protein–Protein Interaction Inhibitors as CNS Therapeutic Agents: Current Progress and Future Hurdles. *Neuropsychopharmacology*, 34 : 126 – 141.
- [49] Blennow, K. 2010. Dementia in 2010: Paving the way for Alzheimer disease drug development. *Nat. Rev. Neurol.*, 7 (2) : 65 - 66.
- [50] Bodles, A.M., Barger, S.W. 2004. Cytokines and the aging brain - what we don't know might help us. *Trends Neurosci.*, 27 (10) : 621 - 626.
- [51] Boland, B., Kumar, A., Lee, S., Platt, F.M., Wegiel, J., Yu, W.H., Nixon, R. A. 2008. Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.*, 28: 6926 – 6937.
- [52] Bonner, T I. 1989. The molecular basis of muscarinic receptor diversity. *Trends Neurosci.*, 12 : 148 – 151.



- [53] Boothby, L.A., Doering, P.L. 2005. Vitamin C and vitamin E for Alzheimer's disease. *Ann. Pharmacother.*, 39 (12) : 2073-2080.
- [54] Bordey, A., Sontheimer, H. 2003. Modulation of glutamatergic transmission by bergmann glial cells in rat cerebellum *in situ*. *J. Neurophysiol.*, 89 (2) : 979 - 988.
- [55] Boundy, K. L., Barnden, L. R., Katsifis, A. G., Rowe, C. C. 2005. Reduced posterior cingulate binding of I-123 iodo-dexetimide to muscarinic receptors in mild Alzheimer's disease. *J. Clin. Neurosci.*, 12 (4) : 421 – 425.
- [56] Bourne, K. Z., Ferrari, D.C., Lange-Dohna, C., Rossner, S., Wood, T.G., Perez-Polo, J.R. 2007. Differential regulation of BACE1 promoter activity by nuclear factor- $\kappa$ B in neurons and glia upon exposure to  $\alpha$ -amyloid peptides. *J. Neurosci. Res.*, 85 : 1194 – 1204.
- [57] Brown, B.S., Yu, S.P. 2000. Modulation and genetic identification of the M channel. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 73: 135-166.
- [58] Brown, D.A., Adams, P.R. 1980. Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K<sup>+</sup> current in a vertebrate neurone. *Nature*, 283: 673 – 676.
- [59] Brown, D. A., Selyanko, A. 1985. Membrane currents underlying the cholinergic slow excitatory post-synaptic potential in the rat sympathetic ganglion. *J. Physiol.*, 365: 365 - 387.
- [60] Brown, D. A. 1988. M - currents. An update. *Trends Neurosci.*, 11 : 294 – 299.
- [61] Brown, D.A., Hughes, S.A., Marsh, S.J., Tinker, A. 2007. Regulation of M (Kv7.2/7.3) channels in neurons by PIP2 and products of PIP2 hydrolysis: significance for receptor mediated inhibition. *J. Physiol.*, 582 (3): 917 – 925.
- [62] Brown, D. A., Passmore, G.M. 2009. Neural KCNQ (Kv7) channels. *Br.J. Pharmacol.*, 156: 1185 - 1195.
- [63] Brouwers, N., Sleegers, K., Van Broeckhoven, C. 2008. Molecular genetics of Alzheimer's disease: an update. *Ann. Med.*, 40 (8) : 562 - 583.
- [64] Brunkan, A.L., Goate, A.M. 2005. Presenilin function and gamma-secretase activity. *J. Neurochem.*, 93 (4) : 769 -792.
- [65] Bu, G. 2009. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nature Rev. Neurosci.*, 10, 333 – 344.
- [66] Buckmaster, P.S., Amaral, D.G. 2001. Intracellular recording and labeling of mossy cells and proximal CA3 pyramidal cells in macaque monkeys. *J. Comp. Neurol.*, 430 (2) : 264 -281.
- [67] Buckmaster, P.S., Alonso, A., Canfield, D.R., Amaral, D.G. 2004. Dendritic morphology, local circuitry, and intrinsic electrophysiology of principal neurons in the entorhinal cortex of macaque monkeys. *J. Comp. Neurol.*, 470: 317 – 329.

- [68] Buckingham, S.D., Jones, A.K., Brown, L.A., Sattelle, D.B. 2009. Nicotinic acetylcholine receptor signalling: roles in Alzheimer's disease and amyloid neuroprotection. *Pharmacol. Rev.*, 61 (1): 39 - 61.
- [69] Butterfield, D.A., Drake, J., Pocernich, C., Castegna, A. 2001. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol. Med.*, 7 : 548 - 554.
- [70] Butterfield, D.A., Pocernich, C. 2005. The Glutamatergic System and Alzheimer's Disease: Therapeutic Implications. *CNS Drugs*, 17 (9): 641 – 652.
- [71] Butterfield, D.A., Abdul, H.M., Opii, W., Newman, S.F., Joshi, G., Ansari, M.A., Sultana, R. 2006. Pin1 in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, 98 (6) :1697 - 1706.
- [72] Caccamo, A., Oddo, S., Sugarman, M.C., Akbari, Y., LaFerla, F.M. 2005. Age- and region-dependent alterations in Abeta-degrading enzymes: implications for Abeta-induced disorders. *Neurobiol Aging*, 26 (5) : 645 - 654.
- [73] Caccamo, A., Oddo, S., Billings, L.M., Green, K.N., Martinez-Coria, H., Fisher, A., LaFerla, F.M. 2006. M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice. *Neuron*, 49 : 671 – 682.
- [74] Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., Pisani, A., Bernardi, G. 1998. Endogenous ACh enhances striatal NMDA-responses via M1-like muscarinic receptors and PKC activation. *Eur. J. Neurosci.*, 10 (9) : 2887 - 2895.
- [75] Canevari, L., Clark, J.B. 2007. Alzheimer's disease and cholesterol: the fat connection. *Neurochem. Res.*, 32 (4-5): 739 – 750.
- [76] Castelan, F., Mulet, J., Aldea, M., Sala, S., Sala, F., Criado, M. 2007. Cytoplasmic regions adjacent to the M3 and M4 transmembrane segments influence expression and function of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors. A study with single amino acid mutants. *J. Neurochem.*, 100 : 406 – 415.
- [77] Catterall, W.A. 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 26 (1) : 13 - 25.
- [78] Caulfield, M. P. 1993. Muscarinic Receptors: Characterization, Coupling and Function. *Pharmacol. Ther.*, 58 : 319 -379.
- [79] Caulfield, M.P., Jones, S., Vallis, Y., Buckley, N.J., Kim, G.D., Milligan, G., Brown, D.A. 1994. Muscarinic M-current inhibition via  $G_{q/11}$  and  $\alpha$ -adrenoceptor inhibition of  $Ca^{2+}$  current via  $G_o$  in rat sympathetic neurones. *J. Physiol.*, 477: 415 – 422.
- [80] Caulfield, M. P., Birdsall, N. J. 1998. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol. Rev.*, 50: 279–290.

- [81] Chavez-Gutiérrez, L., Tolia, A., Maes, E., Li, T., Wong, P.C., De Strooper, B. 2008. Glu (332) in the Nicastrin ectodomain is essential for gamma-secretase complex maturation but not for its activity. *J. Biol. Chem.*, 283 : 20096 - 20105.
- [82] Chen, S., Yaari, Y. 2008. Spike  $\text{Ca}^{2+}$  influx upmodulates the spike afterdepolarization and bursting via intracellular inhibition of Kv7/M channels. *J. Physiol.*, 586 : 1351 – 1363.
- [83] Chen, X., Walker, D.G., Schmidt, A.M., Arancio, O., Lue, L.F., Yan, S.D. 2007. RAGE: a potential target for Abeta-mediated cellular perturbation in Alzheimer's disease. *Curr. Mol. Med.*, 7 (8) : 735-742.
- [84] Chételat, G. 2011. Neuroimaging Alzheimer's disease: early diagnosis, monitoring, and mechanism understanding. *Med. Sci. (Paris)*, 27 (2) : 193 - 198.
- [85] Chitwood, R.A., Jaffe, D.B. 1998. Calcium-dependent spike-frequency accommodation in hippocampal CA3 nonpyramidal neurons. *J. Neurophysiol.*, 80 (2) : 983 - 988.
- [86] Chitwood, R.A., Hubbard, A., Jaffe, D.B. 1999. Passive electrotonic properties of rat hippocampal CA3 interneurons. *J. Physiol.*, 515 (Pt 3): 743 - 756.
- [87] Christensen, D. D. 2007. Changing the Course of Alzheimer Disease: Anti – Amyloid Disease – Modifying Treatments on the Horizon. *Prim. Care Companion J. Clin. Psychiatry*, 9 (1): 32 – 41.
- [88] Christopoulos, A. 2007. Muscarinic acetylcholine receptors in the central nervous system: structure, function and pharmacology. En: Karczmar, A.G ed. *Exploring the Vertebrate Central Cholinergic Nervous System*. New York. p. 163-208.
- [89] Chung, S.H. 2009. Aberrant phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *BMB rep.*, 467 – 474.
- [90] Churcher, I., Beher, D. 2005.  $\gamma$ -Secretase as a therapeutic target for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Design*, 11 : 3363 – 3382.
- [91] Ciaccio, C., Tundo, G.R., Grasso, G., Spoto, G., Marasco, D., Ruvo, M., Gioia, M., Rizzarelli, E., Coletta, M. 2009. Somatostatin: a novel substrate and a modulator of insulin-degrading enzyme activity. *J. Mol. Biol.*, 385 (5) : 1556 - 1567.
- [92] Citron, M. 2004.  $\beta$ -Secretase inhibition for the treatment of Alzheimer's disease — promise and challenge. *Trends Pharmacol. Sci.*, 25: 59 – 112.
- [93] Citron, M. 2010. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 9 (5) : 387 -398.
- [94] Cobb, S.R., Davies, C.H. 2005. Cholinergic modulation of hippocampal cells and circuits. *J Physiol.*, 562: 81 – 88.

- [95] Cohen, I., Miles, M. 2000. Contributions of intrinsic and synaptic activities to the generation of neuronal discharges in *in vitro* hippocampus. *J. Physiol.*, 524 : 485 – 502.
- [96] Cohen, M.L. 2000. Changing patterns of infectious disease. *Nature*, 406: 762-767.
- [97] Cole, D.C., Stock, J.R., Kreft, A.F., Antane, M., Aschmies, S.H., Atchison, K.P., Casebier, D.S., Comery, T.A., Diamantidis, G., Ellingboe, J.W., Harrison, B.L., Hu, Y., Jin, M., Kubrak, D.M., Lu, P., Mann, C.W., Martone, R.L., Moore, W.J., Oganessian, A., Riddell, D.R., Sonnenberg-Reines, J., Sun, S.C., Wagner, E., Wang, Z., Woller, K.R., Xu, Z., Zhou, H., Jacobsen, J.S. 2009. (S)-N-(5-Chlorothiophene-2-sulfonyl)-beta,beta-diethylalaninol a Notch-1-sparing gamma-secretase inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19 (3) : 926-929.
- [98] Colino, A., Muñoz, J. Vara, H. 2002. Plasticidad sináptica a corto plazo. *Rev. Neurol.*, 34 (6) : 593 - 599.
- [99] Conn, P.J., Christopoulos, A., Lindsley, C.W. 2009. Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 8 (1) : 41 - 54.
- [100] Cooper, E. C., Aldape, K. D., Abosch, A., Barbaro, N. M., Berger, M.S., Peacock, W. S., Jan, Y. N., Jan, L. Y. 2000. Colocalization and coassembly of two human brain M-type potassium channel subunits that are mutated in epilepsy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97 : 4914–4919.
- [101] Cooper, E.C., Harrington, E., Jan, Y.N., Jan, L.Y. 2001. M channel KCNQ2 subunits are localized to key sites for control of neuronal network oscillations and synchronization in mouse brain. *J. Neurosci.*, 21 : 9529 – 9540.
- [102] Cooper, E. C. 2006. Exploiting the other inhibitory ion: KCNQ potassium channels and regulation of excitability in developing and mature brain. *Epilepsy Currents*, 6 (4) : 133 – 135.
- [103] Corkin, S., Amaral, D.G., González, R.G., Johnson, K.A., Hyman, B. T. 1997. H.M.'s medial temporal lobe lesion: findings from magnetic resonance imaging. *J. Neurosci.*, 17 : 3964 – 3979.
- [104] Cornelius, C., Fastbom, J., Winblad, B., Viitanen, M. 2004. Aspirin, NSAIDs, risk of dementia, and influence of the apolipoprotein E epsilon 4 allele in an elderly population. *Neuroepidemiology*, 23 (3) : 135 - 143.
- [105] Cotton, C.U. 2000. Basolateral potassium channels and epithelial ion transport. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 23 (3) : 270 -272.
- [106] Cummings, J. L., Doody, R., Clark, C. 2007. Disease – modifying therapies for Alzheimer disease. *Neurology*, 69: 1622- 1634.
- [107] Cruzblanca, H., Koh, D.S., Hille, B., 1998. Bradykinin inhibits M current via phospholipase C and Ca<sup>2+</sup> release from IP3 - sensitive Ca<sup>2+</sup> stores in rat sympathetic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95 : 7151 - 7156.

- [108] D'Andrea, M.R., Nagele, R.G. 2006. Targeting the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor to reduce amyloid accumulation in Alzheimer's disease pyramidal neurons. *Curr. Pharm. Des.*, 12 (6) : 677 - 684.
- [109] Dalley, J.W., Everitt, B.J. 2009. Dopamine receptors in the learning, memory and drug reward circuitry. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 20 (4) : 403 - 410.
- [110] Dani, J.A., Bertrand, D. 2007. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 47 : 699 - 729.
- [111] Danysz, W., Parsons, C.G. 2003. The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: preclinical evidence. *Int. J. Geriatr. Psychiatry*, 18 : 23 - 32.
- [112] Daviglus, M.L., Plassman, B.L., Pirzada, A., Bell, C.C., Bowen, P.E., Burke, J.R., Connolly, E.S., Dunbar-Jacob, J.M., Granieri, E.C., McGarry, K., Patel, D., Trevisan, M., Williams, J.W. 2011. Risk Factors and Preventive Interventions for Alzheimer Disease: State of the Science. *Arch. Neurol.*, 68 (9) : 1185 -1190.
- [113] Davis, C.N., Bradley, S.R., Schiffer, H.H, Friberg, M., Koch, K., Tolf, B.R., Bonhaus, D.W., Lameh, J. 2009. Differential regulation of muscarinic M1 receptors by orthosteric and allosteric ligands. *BMC Pharmacol.*, 9 : 14.
- [114] Davis, A.A., Fritz, J.J., Wess, J., Lah, J.J., Levey, A.I. 2010. Deletion of M1 muscarinic acetylcholine receptors increases amyloid pathology *in vitro* and *in vivo*. *J. Neurosci.*, 30 (12) : 4190 - 4196.
- [115] De Felice, F.G., Velasco, P.T., Lambert, M.P., Viola, K., Fernandez, S.J., Ferreira, S.T., Klein, W.L. 2007. A $\beta$  oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the alzheimer drug memantine. *J. Biol. Chem.*, 282: 11590-11601.
- [116] De los Ríos, C., Orozco, C., García, G. A. 2002. Neuroprotección y Demencias: Receptor Nicotínico versus Receptor NMDA. En: García, G. A., Gandía, L. eds Fronteras en la Enfermedad de Alzheimer. Madrid. p 201 - 229.
- [117] De Meyer, G., Shapiro, F., Vanderstichele, H., Vanmechelen, E., Engelborghs, S., De Deyn, P., Coart, E., Hansson, O., Minthon, L., Zetterberg, H., Blennow, K., Shaw, L., Trojanowski, J. 2010. Diagnosis-Independent Alzheimer Disease Biomarker Signature in Cognitively Normal Elderly People. *Arch. Neurol.*, 67 (8) : 949 - 956.
- [118] De Strooper, B. 2003. Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin Generate an Active  $\gamma$  - Secretase Complex. *Neuron*, Vol. 38, 9-12.
- [119] De Strooper, B. 2010. Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiol. Rev.*, 90 (2) : 465 - 494.

- [120] De Strooper, B., Annaert, W. 2010. Novel research horizons for presenilins and  $\gamma$ -secretases in cell biology and disease. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 26 : 235 - 260.
- [121] De Strooper, B., Vassar, R., Golde, T. 2010. The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.*, 6 (2) : 99 - 107.
- [122] Deane, R., Bell, R.D., Sagare, A., Zlokovic, B.V. 2009. Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS Neurol. Disord. Drug. Targets*, (1) : 16 - 30.
- [123] Dégenétais, E., Thierry, A.M., Glowinski, J., Gioanni, Y. 2002. Electrophysiological Properties of Pyramidal Neurons in the Rat Prefrontal Cortex: An *In Vivo* Intracellular Recording Study. *Cerebral Cortex*. 12 (1): 1-16
- [124] DeKosky, S.T., Williamson, J.D., Fitzpatrick, A.L., Kronmal, R.A., Ives, D.G., Saxton, J.A., López, O.L., Burke, G., Carlson, M.C., Fried, L.P., Kuller, L.H., Robbins, J.A., Tracy, R.P., Woolard, N.F., Dunn, L., Snitz, B.E., Nahin, R.L., Furberg, C.D. 2008. *Ginkgo biloba* for prevention of dementia: a randomized controlled trial. *JAMA*, 300 (19) : 2253 - 2262.
- [125] Delmas, P., Brown, D. 2005. Pathways Modulating Neural KCNQ/M (Kv7) Potassium Channels. *Nature Rev. Neurosci.*, 6 : 850 - 862.
- [126] Deuchars, J., Thomson, A.M. 1996. CA1 pyramid connections in rat hippocampus *in vitro*: dual intracellular recordings with biocytin filling. *Neuroscience*, 74 : 1009 – 1018.
- [127] Devaux, J.J., Kleopa, K.A., Cooper, E.C., Scherer, S.S. 2004. KCNQ2 is a nodal Kchannel. *J. Neurosci.*, 24 : 1236 – 1244.
- [128] Devor A, Yarom Y. 2002. Generation and propagation of subthreshold waves in a network of inferior olivary neurons. *J. Neurophysiol.*, 87 (6) : 3059 - 3069.
- [129] Dickey, C.A., Kamal, A., Lundgren, K., Klosak, N., Bailey, R.M., Dunmore, J., Ash, P., Shoraka, S., Zlatkovic, J., Eckman, C.B., Patterson, C., Dickson, D.W., Nahman, S.N., Hutton, M., Burrows, F., Petrucelli, L. 2007. The high-affinity HSP90- CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tauclent proteins. *J. Clin. Invest.*, 117: 648 – 658.
- [130] Digby, G.J., Shirey, J.K., Conn, P.J. 2010. Allosteric activators of muscarinic receptors as novel approaches for treatment of CNS disorders. *Mol. Biosyst.*, 6 (8) : 1345 - 1354.
- [131] Domínguez, D., Tournoy, J., Hartmann, D., Huth, T., Cryns, K., Deforce, S., Serneels, L., Camacho, I.E., Marjaux, E., Craessaerts, K., Roebroek, A.J., Schwake, M., D'Hooge, R., Bach, P., Kalinke, U., Moechars, D., Alzheimer, C., Reiss, K., Saftig, P., De Strooper, B. 2005. Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice. *J. Biol. Chem.*, 280: 30797 - 30806.

- [132] Dong, X.X., Wang, Y., Qin, Z-H. 2009. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol. Sin.*, 30 (4): 379 – 387.
- [133] Doody, R.S., Gavrilova, S.I., Sano, M., Thomas, R.G., Aisen, P.S., Bachurin, S.O., Seely, L., Hung, D. 2008. Effect of dimebon on cognition, activities of daily living, behaviour, and global function in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet*, 372 (9634) : 207 - 215.
- [134] Doraiswamy, P.M. 2002. Non-cholinergic strategies for treating and preventing Alzheimer's disease. *CNS Drugs*, 16 (12) : 811 - 824.
- [135] Doraiswamy, P.M., Xiong, G.L. 2006. Pharmacological strategies for the prevention of Alzheimer's disease. *Expert Opin. Pharmacother.*, 7 (1) :1 - 10.
- [136] Dubois, B., Feldman, H.H., Jacova, C., Dekosky, S.T., Barberger-Gateau, P., Cummings, J., Delacourte, A., Galasko, D., Gauthier, S., Jicha, G., Meguro, K., O'Brien, J., Pasquier, F., Robert, P., Rossor, M., Salloway, S., Stern, Y., Visser, P.J., Scheltens, P. 2007. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol.*, 6 (8) : 734 - 746.
- [137] Dubois, B., Feldman, H.H., Jacova, C., Cummings, J.L., Dekosky, S.T., Barberger-Gateau, P., Delacourte, A., Frisoni, G., Fox, N.C., Galasko, D., Gauthier, S., Hampel, H., Jicha, G.A., Meguro, K., O'Brien, J., Pasquier, F., Robert, P., Rossor, M., Salloway, S., Sarazin, M., de Souza, L.C., Stern, Y., Visser, P.J., Scheltens, P. 2010. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol.*, 9: 1118 – 1127.
- [138] Dumanchin, C., Tournier, I., Martin, C., Didic, M., Belliard, S., Carlander, B., Rouhart, F., Duyckaerts, C., Pellissier, J.F., Latouche, J.B., Hannequin, D., Frebourg, T., Tosi, M., Campion, D. 2006. Biological effects of four PSEN1 gene mutations causing Alzheimer disease with spastic paraparesis and cotton wool plaques. *Hum. Mutat.*, 27 (10) : 1063 .
- [139] Durham, T. B., Shepherd, T. A. 2006. Progress toward the discovery and development of efficacious BACE inhibitors. *Curr. Opin. Drug Discov. Develop.*, 9 : 776–791.
- [140] Eckman, E. A., Eckman, C. B. 2005. A $\beta$ -degrading enzymes: modulators of Alzheimer's disease pathogenesis and targets for therapeutic intervention. *Biochem. Soc. Trans.*, 23: 1101 – 1105.
- [141] Echegoyen, J., Neu, A., Graber, K.D., Soltesz, I. 2007. Homeostatic plasticity studied using *in vivo* hippocampal activity-blockade: synaptic scaling, intrinsic plasticity and age-dependence. *PLoS One*, 2 (8) : e700.
- [142] Ehehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., Simons, K. 2003. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell. Biol.*, 160 (1) : 113 - 123.

- [143] El-Amouri, S.S., Zhu, H., Yu, J., Marr, R., Verma, I.M., Kindy, M.S. 2008. Neprilysin: An Enzyme Candidate to Slow the Progression of Alzheimer's Disease. *The American Journal of Pathology*, 172 (5) : 1342 - 1354.
- [144] Elliott, A.A., Elliott, J.R. 1993. Characterization of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium currents in small cells from adult rat dorsal root ganglia. *J. Physiol.*, 463 : 39 - 56.
- [145] Ellis, J.R., Ellis, K.A., Bartholomeusz, C.F., Harrison, B.J., Wesnes, K.A., Erskine, F.F., Vitetta, L., Nathan, P.J. 2006. Muscarinic and nicotinic receptors synergistically modulate working memory and attention in humans. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 9 : 175 – 189.
- [146] Elmedy, P., Calloe, K., Schmitt, N., Hansen, R. S., Grunnet, M., Olesen, S.P. 2007. Modulation of ERG Channels by XE991. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 100 : 316 – 322.
- [147] Eglen, R.M. 1998. Muscarinic receptor antagonists. Pharmacological and therapeutic utility. En: Leff, P. ed. *Receptor-based Drug Design*. New York, p. 273–296.
- [148] Eglen, R.M., Choppin, A., Watson, N. 2001. Therapeutic opportunities from muscarinic receptor research. *Trends Pharmacol. Sci.*, 22 (8) : 409 - 414.
- [149] Eglen, R.M. 2006. Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. *Auton. Autacoid. Pharmacol.*, 26 (3) : 219 - 233.
- [150] Ekberg, J., Schuetz, F., Boase, N.A., Conroy, S.J., Manning, J., Kumar, S., Poronnik, P., Adams, D.J. 2007. Regulation of the voltage-gated K(+) channels KCNQ2/3 and KCNQ3/5 by ubiquitination. Novel role for Nedd 4-2. *J. Biol. Chem.*, 282 : 12135 - 12142.
- [151] Enz, A. 2008. Muscarinic Acetylcholine Receptors. En: *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. p 1 – 6.
- [152] Ereshefsky, L., Jhee, S.S., Yen, M., Moran, S.V. 2009. The role for CSF dynabridging studies in developing new therapies for Alzheimer's disease. *Alzheimer Dement.*, 5 (4 Suppl 1) : S414 – S415.
- [153] Eslinger, P.J. 2010. Functional Neuroanatomy of the Limbic System. En: Davis, A. S. ed *Pediatric Neuropsychology*. New York. p 137 - 146.
- [154] Etgen, A.M. 2008. Estrogens and Alzheimer's Disease: Is Cholesterol a Link? *Endocrinology*, 149 (9) : 4253 – 4255.
- [155] Faber, E.S., Sah, P. 2002. Physiological role of calcium-activated potassium currents in the rat lateral amygdala. *J. Neurosci.*, 22: 1618-1628.
- [156] Fan, M.Y., Raymond, L.A., 2007. N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. *Neurobiology*, 81: 272 – 293.
- [157] Farlow. M.P. 2004. Utilizing combination therapy in the treatment of Alzheimer's disease (Review). *Expert Rev. Neurother.*, 4 (5): 799 - 808.



- [158] Farooqui, T., Farooqui, A. A. 2009. Aging: an important factor for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Mech. Ageing Dev.*, 130 : 203 –215.
- [159] Feldman, H.H., Doody, R.S., Kivipelto, M., Sparks, D.L., Waters, D.D., Jones, R.W., Schwam, E., Schindler, R., Hey-Hadavi, J., DeMicco, D.A., Breazna, A. 2010. Randomized controlled trial of atorvastatin in mild to moderate Alzheimer disease: LEADe. *Neurology*, 74 (12) : 956 -964.
- [160] Fenili, D., McLaurin, J. 2005. Cholesterol and apoe: a target for Alzheimer's disease therapeutics. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.*, 4 (5) : 553 - 567.
- [161] Fernández de Sevilla, D., Cabezas, C., de Prada, A.N., Sánchez-Jiménez, A., Buño, W. 2002. Selective muscarinic regulation of functional glutamatergic Schaffer collateral synapses in rat CA1 pyramidal neurons. *J. Physiol.*, 545 (Pt 1) : 51 - 63.
- [162] Finehout, E.J., Franck, Z., Choe, L.H., Relkin, N., Lee, K.H. 2007. Cerebrospinal fluid proteomic biomarkers for Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.*, 61: 120 – 129.
- [163] Fisahn, A., Yamada, M., Duttaroy, A., Gan, J.W., Deng, C.X., McBain, C.J., Wess, J. 2002. Muscarinic induction of hippocampal gamma oscillations requires coupling of the M1 receptor to two mixed cation currents. *Neuron*, 33 (4) : 615 - 624.
- [164] Fisher, A., Pittel, Z., Haring, R., Bar-Ner N, Kliger-Spatz M, Natan N, Egozi I, Sonogo H, Marcovitch I, Brandeis R. 2003. M1 muscarinic agonists can modulate some of the hallmarks in Alzheimer's disease: implications in future therapy. *J. Mol. Neurosci.*, 20 : 349 – 356.
- [165] Fisher, A. 2007. M1 muscarinic agonists target major hallmarks of Alzheimer's disease—an update. *Curr. Alzheimer Res.*, 4 (5) : 577 - 580.
- [166] Fisher, A. 2008. Cholinergic treatments with emphasis on M1 muscarinic agonists as potential disease modifying agents for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, 5 (3) : 433 - 442.
- [167] Flagmeyer, I., Van der Staay, F.J. 1995. Linopiridine: its effects in the Morris water escape tank and on retention of an incompletely acquired bar-press response in rodents. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 51 (1) : 111 - 117.
- [168] Flynn, D. D., Reeve, C. M., Ferrari-Dileo, G. 1997. Pharmacological strategies to selectively label and localize muscarinic receptor subtypes. *Drug Dev. Res.*, 40 : 104 – 116.
- [169] Fontán-Lozano, A., Suárez-Pereira, I., Delgado-García, J.M., Carrión, A.M. 2011. The M-current inhibitor XE991 decreases the stimulation threshold for long-term synaptic plasticity in healthy mice and in models of cognitive disease. *Hippocampus*, 21 (1) : 22 - 32.
- [170] Fontana, D.J., Inouye, G.T., Johnson, R.M. 1994. Linopirdine (DuP 996) improves performance in several tests of learning and memory by modulation of cholinergic neurotransmission. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 49 (4) : 1075 - 1082.

- [171] Ford, C. P., Stemkowski, P. L., Smith, P. A. 2004. Possible role of phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate in luteinizing hormone releasing hormone-mediated M-current inhibition in bullfrog sympathetic neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 20: 2990 – 2998.
- [172] Franceschetti, S., Taverna, S., Sancini, G., Panzica, F., Lombardi, R., Avanzini, G. 2000. Protein kinase C-dependent modulation of Na<sup>+</sup> currents increases the excitability of rat neocortical pyramidal neurones. *J. Physiol.*, 528 (Pt 2) : 291 - 304.
- [173] Frank, L.M., Brown, E.N., Wilson, M.A. 2001. A comparison of the firing properties of putative excitatory and inhibitory neurons from CA1 and the entorhinal cortex. *J. Neurophysiol.*, 86 : 2029 -2040.
- [174] French, J.A., Abou-Khalil, B.W., Leroy, R.F., Yacubian, E.M., Shin, P., Hall, S., Mansbach, H., Nohria, V. 2011. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of ezogabine (retigabine) in partial epilepsy. *Neurology*, 76 (18) : 1555 - 1563.
- [175] Frenkel, D., Maron, R., Burt, D.S., Weiner, H.L. 2005. Nasal vaccination with a proteosome-based adjuvant and glatiramer acetate clears  $\beta$ -amyloid in a mouse model of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.*, 115 (9) :2423–2433.
- [176] Freund, T.F, Buzsáki G., 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6 (4) : 347 - 370.
- [177] Friedman, L.K. 2006. Calcium: a role for neuroprotection and sustained adaptation. *Mol. Interv.*, 6: 315 –329.
- [178] Fuentes, G.P., Slachevsky, Ch. A. 2005. Enfermedad de Alzheimer: Actualización en la Terapia Farmacológica. *Rev. Med. Chil.*, 133 : 224 -230.
- [179] Fukumoto, H., Tokuda, T., Kasai, T., Ishigami, N., Hidaka, H., Kondo, M., Allsop, D., Nakagawa, M. 2010. High-molecular-weight beta-amyloid oligomers are elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. *FASEB J.*, 24 (8) : 2716 - 2726.
- [180] Funderburk, S.F., Marcellino, B.K., Yue, Z. 2010. Cell "self-eating" (autophagy) mechanism in Alzheimer's disease. *Mt. Sinai J. Med.*, 77 (1) : 59 - 68.
- [181] Gahwiler, B.H., Brown, D. A. 1985. Functional innervation of cultured hippocampal neurons by cholinergic afferents from co-cultured septal explants. *Nature*, 313 : 577 - 579.
- [182] Gamper, N., Shapiro, M.S. 2003. Calmodulin mediates Ca<sup>2+</sup>-dependent modulation of M-type K<sup>+</sup> channels. *J. Gen. Physiol.*, 122: 17 – 31.
- [183] Gamper, N., Li, Y., Shapiro, M. S. 2005. Structural requirements for differential sensitivity of KCNQ K<sup>+</sup> channels to modulation by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. *Mol. Biol. Cell*, 16 : 3538 – 3551.
- [184] Gamper, Shapiro, M. S. 2007. Regulation of ion transport proteins by membrane phosphoinositides. *Nat Rev Neurosci.*, 8 : 921 -934.

- [185] Gandía, L., Rojo, J., González, J. R., Tapia, L., de Pascual, R., Hernández, G. J. 2002. Dianas Terapéuticas Colinérgicas en la Enfermedad de Alzheimer. En: García, G. A., Gandía, L. eds *Fronteras en la Enfermedad de Alzheimer*. Madrid. p 119 – 140.
- [186] Gautam, D., Duttaroy, A., Cui, Y., Han, S.J., Deng, C., Seeger, T., Alzheimer, C., Wess, J. 2006. M1-M3 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice: novel phenotypes. *J. Mol. Neurosci.*, 30 (1-2) : 157 - 160.
- [187] Geerts, H., Grossberg, G.T. 2006. Pharmacology of acetylcholinesterase inhibitors and N-methyl-D-aspartate receptors for combination therapy in the treatment of Alzheimer's disease. *J. Clin. Pharmacol.*, 46 (7 Suppl 1) : S8 - S16.
- [188] Gervais, F., Paquette, J., Morissette, C., Krzywkowski, P., Yu, M., Azzi, M., Lacombe, D., Kong, X., Aman, A., Laurin, J., Szarek, W.A., Tremblay, P. 2007. Targeting soluble Abeta peptide with Tramiprosate for the treatment of brain amyloidosis. *Neurobiol. Aging*, 28 (4) : 537 - 547.
- [189] Ghavami, A., Hirst, W.D., Novak, T.J. 2006. Selective phosphodiesterase (PDE)-4 inhibitors: a novel approach to treating memory deficit? *Drugs R. D.*, 7 (2) : 63 - 71.
- [190] Ghosh, A.K., Bilcer, G., Hong, L., Koelsch, G., Tang, J. 2007. Memapsin 2 (betasecretase) inhibitor drug, between fantasy and reality. *Curr. Alzheimer Res.*, 4 : 418 – 422.
- [191] Ghosh, A.K., Gemma, S., Tang, J. 2008. beta-Secretase as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, 5 : 399 – 408.
- [192] Gillies, G.E., McArthur, S. 2010. Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines. *Pharmacol. Rev.*, 62 (2) : 155 - 198.
- [193] Gilman, S., Koller, M., Black, R.S., Jenkins, L., Griffith, S.G., Fox, N.C., Eisner, L., Kirby, L., Rovira, M.B., Forette, F., Orgogozo, J.M. 2005. Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology*, 64 (9) : 1553 - 1562.
- [194] Goate, A. 2006. Segregation of a missense mutation in the amyloid  $\beta$ -protein precursor genewith familial Alzheimer's disease. En: Jucker, M. y cols eds. *Alzheimer: 100 Years and Beyond*. Berlin. p 157 – 162.
- [195] Goedert, M., Klug, A., Crowther, R. 2006. Tau protein, the paired helical filament and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, 9 : 195 – 207.
- [196] Goedert, M., Spillantini, M.G., 2006. A Century of Alzheimer's Disease (Review). *Science*, 314 : 777 – 781.
- [197] Gómez-Isla, T., Spires, T., DeCalignon, A., Hyman, B.T. 2008. Neuropathology of Alzheimer's Disease. En: Duyckaerts, C., Litvan, I. eds *Dementias: Handbook of Clinical Neurology*. Amsterdam. p 233 – 244.

- [198] Gong, Y., Chang, L., Viola, K.L., Lacor, P.N., Lambert, M.P., Finch, C.E., Krafft, G.A., Klein, W.L. 2003. Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100 (18) : 10417 - 10422.
- [199] Gong, C., Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. 2006. Dysregulation of Protein Phosphorylation/Dephosphorylation in Alzheimer's Disease: A Therapeutic Target (Review). *J. Biomed. Biotechnol.*, 2006 (3) : 31825.
- [200] Gotti, C., Zoli, M., Clementi, F. 2006. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol. Sci.*, 27 (9) : 482 - 491.
- [201] Grbovic, O.M., Mathews, P.M., Jiang, Y., Schmidt, S.D., Dinakar, R., Summers-Terio, N.B., Ceresa, B.P., Nixon, R.A., Cataldo, A.M. 2003. Rab5-stimulated up-regulation of the endocytic pathway increases intracellular beta-cleaved amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment levels and Abeta production. *J. Biol. Chem.*, 278 (33) : 31261 - 31268.
- [202] Green, K.N., Smith, I.F., LaFerla, F.M. 2007. Role of calcium in the pathogenesis of Alzheimer's disease and transgenic models. *Subcell. Biochem.*, 45 : 507-521.
- [203] Green, K.N., LaFerla, F.M. 2008. Linking calcium to Aβ and Alzheimer's disease. *Neuron*, 59 : 190 - 194.
- [204] Gu, N., Vervaeke, K., Hu, H., Storm, J.F. 2005. Kv7/KCNO/M and HCN/h, but not KCa2/SK channels, contribute to the somatic medium after-hyperpolarization and excitability control in CA1 hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol.*, 566 (Pt 3) : 689 - 715.
- [205] Guan, Z., Zhang, X., Ravid, R., Nordberg, A. 2000. Decreased Protein Levels of Nicotinic Receptor Subunits in the Hippocampus and Temporal Cortex of Patients with Alzheimer's Disease. *J. Neurochem.*, 74: 237 – 243.
- [206] Guardia-Laguarta, C., Coma, M., Pera, M., Clarimón, J., Sereno, L., Agulló, J.M., Molina-Porcel, L., Gallardo, E., Deng, A., Berezovska, O., Hyman, B.T., Blesa, R., Gómez-Isla, T., Lleó, A. 2009. Mild cholesterol depletion reduces amyloid-β production by impairing APP trafficking to the cell surface. *J. Neurochem.*, 110 (1) : 220 -230.
- [207] Guardia-Laguarta, C. 2010. Efecto de las manipulaciones genéticas y farmacológicas sobre la actividad del complejo gamma-secretasa. [Tesis Doctoral] Barcelona, España.
- [208] Guasti, L., Cilia, E., Crociani, O., Hofmann, G., Polvani, S., Becchetti, A., Wanke, E., Tempia, F., Arcangeli, A. 2005. Expression pattern of the ether-a-go-go-related (ERG) family proteins in the adult mouse central nervous system: evidence for coassembly of different subunits. *J. Comp. Neurol.*, 491 : 157 – 174.
- [209] Guérineau, N.C., Bossu, J.L., Gähwiler, B.H., Gerber, U. 1995. Activation of a nonselective cationic conductance by metabotropic glutamatergic and muscarinic agonists in CA3 pyramidal neurons of the rat hippocampus. *J. Neurosci.*, 15 (6) : 4395 - 4407.

- [210] Guérineau, N.C., Bossu, J.L., Gähwiler, B.H., Gerber, U. 1997. G-protein-mediated desensitization of metabotropic glutamatergic and muscarinic responses in CA3 cells in rat hippocampus. *J. Physiol.*, 500 ( Pt 2): 487 - 496.
- [211] Guo, J., Schofield, G. G., 2002. Histamine inhibits KCNQ2/KCNQ3 channel current via recombinant histamine H(1) receptors. *Neurosci. Lett.*, 328: 285 - 288.
- [212] Gutman, G.A., Chandy, K.G., Adelman, J.P., Aiyar, J., Bayliss, D.A., Clapham, D.E., Covarrubias, M., Desir, G.V., Furuichi, K., Ganetzky, B., Garcia, M.L., Grissmer, S., Jan, L.Y., Karschin, A., Kim, D., Kuperschmidt, S., Kurachi, Y., Lazdunski, M., Lesage, F., Lester, H.A., McKinnon, D., Nichols, C.G., O'Kelly, I., Robbins, J., Robertson, G.A., Rudy, B., Sanguinetti, M., Seino, S., Stuehmer, W., Tamkun, M.M., Vandenberg, C.A., Wei, A., Wulff, H., Wymore, R.S. 2003. International Union of Pharmacology.XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: Potassium channels. *Pharmacol. Rev.*, 55: 583 – 586.
- [213] Hadley, J.K., Passmore, G.M., Tatulian, L., Al-Qatari, M., Ye, F., Wickenden, A.D., Brown, D.A. 2003. Stoichiometry of expressed KCNQ2/KCNQ3 potassium channels and subunit composition of native ganglionic M channels deduced from block by tetraethylammonium. *J. Neurosci.*, 23 : 5012 – 5019.
- [214] Hagenston, A.M., Rudnicka, N. D., Boonea, C. E., Mark F. Yeckel, M. F. 2009. 2 Aminoethoxydiphenyl-borate (2-APB) increases excitability in pyramidal neurons. *Cell Calcium*, 45: 310 – 317.
- [215] Haitin, Y., Attali, B. 2008. The C-terminus of Kv7 channels: a multifunctional module. *J. Physiol.*, 586 (7) : 1803 - 1810.
- [216] Haley, J. E., Abogadie, F. C., Fernandez-Fernandez, J., Dayrell, M., Vallis, Y., Buckley, N. J., Brown, D. A. 2000. Bradykinin, But Not Muscarinic, Inhibition of M-Current in Rat Sympathetic Ganglion Neurons Involves Phospholipase C- $\beta$ 4. *J. Neurosci*, 20 : 1 - 5.
- [217] Halliwell, J.V., Adams, P. R., 1982. Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res.*, 250: 71 - 92.
- [218] Hammer, R., Berrie, C.P., Birdsall, N.J., Burgen, A.S. y Hulme, E.C. 1980. Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature*, 283 : 90 - 92.
- [219] Hampel, H., Frank, R., Broich, K., Teipel, S.J., Katz, R.G., Hardy, J., Herholz, K., Bokde, A.L., Jessen, F., Hoessler, Y.C., Sanhai, W.R., Zetterberg, H., Woodcock, J., Blennow, K. 2010. Biomarkers for Alzheimer's disease: academic, industry and regulatory perspectives. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 9 (7) : 560 - 574.
- [220] Hanger, D.P., Anderton, B.H., Noble, W. 2009. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol. Med.*, 15 (3) :112 -119.
- [221] Hansen, H. H., Waroux, O., Seutin, V., Jentsch, T.J., Aznar, S., Mikkelsen, J.D. 2008. Kv7 channels: interaction with dopaminergic and serotonergic neurotransmission in the CNS. *J. Physiol.*, 586: 1823 – 1832.

- [222] Hara, S., Mukai, T., Kuriwa, F., Iwata, N., Yanase, T., Kano, S., Endo, T. 1997. Distinct effects of MK-801 and (+/-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid on N-methyl-D-aspartate-induced rise of brain temperature in rats. *Life Sci.*, 61 (20) : 289 - 294.
- [223] Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., Mizushima, N. 2006. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441 (7095) : 885 - 889.
- [224] Hardy, J. 2006a. A hundred years of Alzheimer's disease research. *Neuron*, 52 : 3 -13.
- [225] Hardy, J. 2006b. Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis: An update and reappraisal. *J. Alzheimers Dis.*, 9: 151 – 153.
- [226] Hardy, 2006c. The Amyloid Hypothesis: history and alternatives. En: Jucker, M. y cols eds. Alzheimer: 100 Years and Beyond. Berlin. p 151 – 154.
- [227] Harman, D. 2006. Alzheimer's disease pathogenesis: role of aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1067 : 454 -460.
- [228] Harrington, C., Sawchak, S., Chiang, C., Davies, J., Saunders, A., Irizarry, M., Zvartau-Hind, M., van Dyck, C., Gold, M. 2009. Effects of rosiglitazone-extended release as adjunctive therapy to acetylcholinesterase inhibitors over 48 weeks on cognition in Apoe4- stratified subjects with mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.*, 5 (Suppl. 1): e17– e18.
- [229] Hartmann T. 2006. Role of amyloid precursor protein, amyloid-beta and gamma-secretase in cholesterol maintenance. *Neurodegener. Dis.*, 3 (4-5) : 305 - 311.
- [230] Hasselmo, M. E. 2006. The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 16 : 710 – 715.
- [231] Hatters, D.M., Peters-Libeu, C.A., Weisgraber, K.H. 2006. Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends Biochem. Sci.*, 31 (8) : 445 - 454.
- [232] He, G., Luo, W., Li, P., Remmers, C., Netzer, W.J., Hendrick, J., Bettayeb, K., Flajolet, M., Gorelick, F., Wennogle, L.P., Greengard, P. 2010. Gamma-secretase activating protein is a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Nature*, 467 (7311) : 95 - 98.
- [233] Hebert, S.S., Serneels, L., Tolia, A., Craessaerts, K., Derks, C., Filippov, M.A., Muller, U., De Strooper, B. 2006. Regulated intramembrane proteolysis of amyloid precursor protein and regulation of expression of putative target genes. *EMBO Rep.*, 7 : 739 – 745.
- [234] Heinrich, J.N., Butera, J.A., Carrick, T., Kramer, A., Kowal, D., Lock, T., Marquis, K.L., Pausch, M.H., Popielek, M., Sun, S.C., Tseng, E., Uveges, A.J., Mayer, S.C. 2009. Pharmacological comparison of muscarinic ligands: historical versus more recent muscarinic M1-preferring receptor agonists. *Eur. J. Pharmacol.*, 605 (1- 3) : 53 - 56.

- [235] Hellstrom-Lindahl, E., Mousavi, M., Zhang, X., Ravid, R., Nordberg, A., 1999. Regional Distribution of Nicotinic Receptor subunit mRNAs in Human Brain: Comparison between Alzheimer and Normal Brain. *Mol. Brain Res.*, 66: 94 – 103.
- [236] Hemond, P., Epstein, D., Boley, A., Migliore, M., Ascoli, G.A., Jaffe, D.B. 2008. Distinct classes of pyramidal cells exhibit mutually exclusive firing patterns in hippocampal area CA3b. *Hippocampus*, 18 (4): 411 - 424.
- [237] Hemond, P., Migliore, M., Ascoli, G.A., Jaffe, D.B. 2009. The membrane response of hippocampal CA3b pyramidal neurons near rest: Heterogeneity of passive properties and the contribution of hyperpolarization-activated currents. *Neuroscience*, 160 (2) : 359 – 370.
- [238] Henderson, V.W. 2009. Estrogens, episodic memory, and Alzheimer's disease: a critical update. *Semin. Reprod. Med.*, 27 (3) : 283 - 293.
- [239] Henderson, V.W. 2010. Action of estrogens in the aging brain: dementia and cognitive aging. *Biochim. Biophys. Acta*, 1800 (10) : 1077 - 1083.
- [240] Henderson, V.W., Brinton, R.D. 2010. Menopause and mitochondria: windows into estrogen effects on Alzheimer's disease risk and therapy. *Prog. Brain Res.*, 182 : 77 - 96.
- [241] Heneka, M. T., Landreth, G. E. 2007. PPARs in the brain. *Biochem. Biophys. Acta*, 1771: 1031 –1045.
- [242] Herbert, J.M., Augereau, J.M., Gleye, J., Maffrand, J.P. 1990. Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172 (3) : 993 - 999.
- [243] Hernández, C.C., Zaika, O., Shapiro, M.S. 2008a. A carboxy-terminal interhelix linker as the site of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate action on Kv7 (M-type) K<sup>+</sup> channels. *J. Gen. Physiol.*, 132: 361 – 381.
- [244] Hernández, C.C., Zaika, O., Tolstikh, G.P., Shapiro, M.S. 2008b. Regulation of neural KCNQ channels: signalling pathways, structural motifs and functional implications. *J. Physiol.*, 586 (7) : 1811 – 1820.
- [245] Hille, B. 1994. Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci.*, 17 (12) : 531 - 536.
- [246] Hiraoka, Y., Ohno, M., Yoshida, K., Okawa, K., Tomimoto, H., Kita, T., Nishi, E. 2007. Enhancement of alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein by a metalloendopeptidase nardilysin. *J. Neurochem.*, 102 (5) : 1595 - 1605.
- [247] Hoe, H.S., Freeman, J., Rebeck, G.W. 2006. Apolipoprotein E decreases tau kinases and phospho-tau levels in primary neurons. *Mol. Neurodegener.*, 1: 18.
- [248] Hogg, R.C., Buisson, B., Bertrand, D. 2005. Allosteric modulation of ligand-gated ion channels. *Biochem. Pharmacol.*, 70: 1267 – 1276.

- [249] Hollingworth, P., Harold, D., Sims, R., Gerrish, A., Lambert, J.C., Carrasquillo, M.M., Abraham, R., Hamshere, M.L., Pahwa, J.S., Moskva, V. y cols. 2011. Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.*, 43 (5) : 429 - 435.
- [250] Holmes, C., Boche, D., Wilkinson, D., Yadegarfar, G., Hopkins, V., Bayer, A., Jones, R.W., Bullock, R., Love, S., Neal, J.W., Zotova, E., Nicoll, J.A. 2008. Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet*, 372 (9634) : 216 - 223.
- [251] Holtzman, D.M., Morris, J.C., Goate, A.M. 2011. Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci. Transl. Med.*, 3 (77): 77sr1.
- [252] Hong-Sheng, W., Pan, Z., Shi, W., Brown, B.S., Wymore, R. S., Cohen, I. S., Jane E. Dixon, J. E., McKinnon, E. 1998. KCNQ2 and KCNQ3 Potassium Channel Subunits: Molecular Correlates of the M-Channel. *Science*, 282: 1890 – 1892.
- [253] Hooper, C., Killick, R., Lovestone, S. 2008. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, 104: 1433 - 1439.
- [254] Hoshi, N., Zhang, J.S., Omaki, M., Takeuchi, T., Yokoyama, S., Wanaverbecq, N., Langeberg, L.K., Yoneda, Y., Scott, J.D., Brown, D.A., Higashida, H. AKAP150 signaling complex promotes suppression of the M-current by muscarinic agonists. *Nat. Neurosci.*, 6 : 564 – 571.
- [255] Hotson, J.R., Prince, D.A., Schwartzkroin, P.A. 1979. Anomalous inward rectification in hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.*, 42 (3) : 889 - 895.
- [256] Howard, R.J., Clark, K.A., Holton, J.M., Minor, D.L. 2007. Structural insight into KCNQ (Kv7) channel assembly and channelopathy. *Neuron*, 53 (5) : 663 - 675.
- [257] Hu, H., Vervaeke, K., Storm, J.F. 2002. Two forms of electrical resonance at theta frequencies, generated by M-current, h-current and persistent Na<sup>+</sup> current in rat hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol.*, 545: 783 – 805.
- [258] Hu, H., Vervaeke, K., Storm, J.F. 2007. M-channels (Kv7/KCNQ channels) that regulate synaptic integration, excitability, and spike pattern of CA1 pyramidal cells are located in the perisomatic region. *J. Neurosci.*, 27 (8) : 1853 - 1867.
- [259] Hu, X., Hicks, C.W., He, W., Wong, P., Macklin, W.B., Trapp, B.D., Yan, R. 2006. Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat. Neurosci.*, 9 (12) : 1520 - 1525.
- [260] Hu, X., He, W., Diaconu, C., Tang, X., Kidd, G.J., Macklin, W.B., Trapp, B.D., Yan, R. 2008. Genetic deletion of BACE1 in mice affects remyelination of sciatic nerves. *FASEB J.*, 22: 2970 –2980.
- [261] Hulme, E.C., Birdsall, N.J., Buckley, N. 1990. Muscarinic receptor subtypes. *Annu. Rev. Toxicol.*, 30 : 277 – 295.



- [262] Hung, L.W., Ciccotosto, G.D., Giannakis, E., Tew, D.J., Perez, K., Masters, C.L., Cappai, R., Wade, J.D., Barnham, K.J. 2008. Amyloid-beta peptide (A $\beta$ ) neurotoxicity is modulated by the rate of peptide aggregation: A $\beta$  dimers and trimers correlate with neurotoxicity. *J. Neurosci.*, 28: 11950 –11958.
- [263] Iarriccio-Silva, L. 2008. Allosteric interactions at the M3 muscarinic acetylcholine receptor. [Tesis Doctoral] Barcelona, España; Londres, Inglaterra.
- [264] Insausti, R., Amaral, D.G. 2004. Hippocampal formation. En: Paxinos, G. y Mai, J.K. eds. The human nervous system. Amsterdam. p 871–914.
- [265] Ira, F. S. 2008. Fisiología Humana. Décima edición. Mc Graw Hill eds. p 182 – 190.
- [266] Ishii, M., Kurachi, Y. 2006. Muscarinic acetylcholine receptors. *Curr. Pharm. Des.*, 12 (28) : 3573 - 3581.
- [267] Itzhaki, R., 2004. Herpes simplex virus type 1, apolipoprotein E and Alzheimer' disease. *Herpes*, (11 Suppl 2) : 77A - 82A.
- [268] Itzhaki, R.F., Wozniak, M.A. 2006. Herpes simplex virus type 1, apolipoprotein E, and cholesterol: a dangerous liaison in Alzheimer's disease and other disorders. *Prog. Lipid. Res.*, 45 (1) : 73 - 90.
- [269] Itzhaki, R.F., Cosby, S. L., Wozniak, M.A. 2008. Herpes Simplex Virus Type 1 and Alzheimer's Disease. *J. Neurovirol.*, 14 (1) : 1 – 4.
- [270] Itzhaki, R.F., Wozniak, M.A. 2008. Herpes Simplex Virus Type 1 in Alzheimer's Disease: The Enemy Within. *J. Alzheimers Dis.*, 13: 393 – 405.
- [271] Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Shirotani, K., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., Hama, E., Lee, H.J., Saido, T.C. 2001. Metabolic regulation of brain A $\beta$  by neprilysin. *Science*, 292 : 1550 – 1552.
- [272] Jacobsen, J.S., Reinhart, P., Pangalos, M.N. 2005. Current concepts in therapeutic strategies targeting cognitive decline and disease modification in Alzheimer's disease. *NeuroRx.*, 2 (4) : 612 - 626.
- [273] Jensen, M.S., Yaari, Y. 1997. Role of intrinsic burst firing, potassium accumulation, and electrical coupling in the elevated potassium model of hippocampal epilepsy. *J. Neurophysiol.*, 77 (3) : 1224 - 1233.
- [274] Jentsch, T.J., 2000. Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, 1: 21–30.
- [275] Jeon, J., Dencker, D., Wörtwein, G., Woldbye, D.P., Cui, Y., Davis, A.A., Levey, A.I., Schütz, G., Sager, T.N., Mørk, A., Li, C., Deng, C.X., Fink-Jensen, A., Wess, J. 2010. A subpopulation of neuronal M4 muscarinic acetylcholine receptors plays a critical role in modulating dopamine-dependent behaviors. *J. Neurosci.*, 30 (6) : 2396 - 2405.

- [276] Jespersen, T., Grunnet, M., Olesen, S.P. 2005. The KCNQ1 potassium channel: from gene to physiological function. *Physiology*, 20 : 408 – 416.
- [277] Jiang, Y., MacKinnon, R. 2000. The barium site in a potassium channel by X-ray crystallography. *J. Gen. Physiol.*, 115 (3) : 269 - 272.
- [278] Johnston, D., Amaral, D.G. 2004. Hippocampus. En: Shepherd, G.M. eds The synaptic organization of the brain. Oxford. p 455–498.
- [279] Johnston, J.A., Liu, W.W., Todd, S.A., Coulson, D.T., Murphy, S., Irvine, G.B., Passmore, A.P. 2005. Expression and activity of beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme in Alzheimer's disease. *Biochem. Soc. Trans.*, 33 (5) : 1096 - 1100.
- [280] Jones, C.K., Brady, A.E., Davis, A.A., Xiang, Z., Bubser, M., Tantawy, M.N., Kane, A.S., Bridges, T.M., Kennedy, J.P., Bradley, S.R., Peterson, T.E., Ansari, M.S., Baldwin, R.M., Kessler, R.M., Deutch, A.Y., Lah, J.J., Levey, A.I., Lindsley, C.W., Conn, P.J. 2008. Novel selective allosteric activator of the M1 muscarinic acetylcholine receptor regulates amyloid processing and produces antipsychotic-like activity in rats. *J. Neurosci.*, 28 (41) : 10422 - 10433.
- [281] Jones, P.B., Adams, K.W., Rozkalne, A., Spires-Jones, T. L., Hshieh, T.T., Hashimoto, T., von Armin, C.A.F., Mielke, M., Bacskai, B.J., Hyman, B.T. 2011. Apolipoprotein E: Isoform Specific Differences in Tertiary Structure and Interaction with Amyloid- $\beta$  in Human Alzheimer Brain. *PLoS One*, 6(1): e14586
- [282] Jung, K.H., Chu, K., Lee, S.T., Park, H.K., Kim, J.H., Kang, K.M., Kim, M., Lee, S.K., Roh, J.K. 2009. Augmentation of nitrite therapy in cerebral ischemia by NMDA receptor inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 378 : 507 – 512.
- [283] Kálmán, J., Janka, Z. 2005. Cholesterol and Alzheimer's disease. *Orv. Hetil.*, 146 (37) : 1903 -1911.
- [284] Kametani, F. 2008. Epsilon-secretase: reduction of amyloid precursor protein epsilon-site cleavage in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.*, 5 (2) : 165 - 171.
- [285] Kandel, E.R., Kupfermann, I., Iversen, S. 2000. Learning and Memory. En: Kandel y cols. eds. Principles of Neural Science. New York. p 1228 – 1247.
- [286] Kantarci, K., Lowe, V., Przybelski, S.A., Senjem, M.L., Weigand, S.D., Ivnik, R.J., Roberts, R., Geda, Y.E., Boeve, B.F., Knopman, D.S., Petersen, R.C., Jack, C.R. 2011. Magnetic resonance spectroscopy,  $\beta$ -amyloid load, and cognition in a population-based sample of cognitively normal older adults. *Neurology*, 77 (10) : 951 - 958.
- [287] Kao, S.C., Krichevsky, A.M., Kosik, K.S., Tsai, L.H. 2004. BACE1 suppression by RNA interference in primary cortical neurons. *J. Biol. Chem.*, 279 (3) : 1942 – 1949.
- [288] Karlinski, R., Wilcock, D., Dickey, C., Ronan, V., Gordon, M.N., Zhang, W., Morgan, D., Taglialetela, G. 2007. Up-Regulation of Bcl-2 in APP Transgenic Mice is Associated with Neuroprotection. *Neurobiol. Dis.*, 25 (1): 179 – 188.

- [289] Kastanauskaite, A. 2009. Alteraciones del hipocampo esclerótico y de la corteza temporal adyacente en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal. [Tesis Doctoral] Madrid, España.
- [290] Kidd, J.F., Sattelle, D.B. 2006. The effects of amyloid peptides on A-type K<sup>(+)</sup> currents of *Drosophila* larval cholinergic neurons: modeled actions on firing properties. *Invert. Neurosci.*, 6 (4) : 207 - 213.
- [291] Kim, Y.H., Lee, Y., Kim, D., Jung, M.W., Lee, C.J. 2010. Scopolamine-induced learning impairment reversed by physostigmine in zebrafish. *Neurosci. Res.*, 67 (2) :156-161.
- [292] Kitazawa, M., Trinh, D., LaFerla, F. M. 2008. Inflammation induces tau hyperphosphorylation in a mouse model of inclusion body myositis via a mechanism involving glycogen synthase kinase-3 $\beta$ . *Ann. Neurol.*, 64 : 15 - 24.
- [293] Kivipelto, M., Solomon, A. 2006. Cholesterol as a risk factor for Alzheimer's disease - epidemiological evidence. *Acta Neurol. Scand. Suppl.*, 185 : 50 - 57.
- [294] Klink, R., Alonso, A. 1997a. Muscarinic modulation of the oscillatory and repetitive firing properties of entorhinal cortex layer II neurons. *J. Neurophysiol.*, 77 (4) : 1813 - 1828.
- [295] Klink, R., Alonso, A. 1997b. Ionic mechanisms of muscarinic depolarization in entorhinal cortex layer II neurons. *J. Neurophysiol.*, 77 (4) : 1829 - 1843.
- [296] Knudsen, M. G. 2003. Assessment of neuroreceptor changes in healthy ageing and in Alzheimer's disease with emission tomography. *International Congress Series*, 1252: 299 – 308.
- [297] Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K. 2006. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, 441 (7095) : 880 - 884.
- [298] Kooistra, J., Milojevic, J., Melacini, G., Ortega, J. 2009. A New Function of Human HtrA2 as an Amyloid Beta Oligomerization Inhibitor. *J. Alzheimers Dis.*, 17 (2) : 281 – 294.
- [299] Korotkova, T.M., Eriksson, K.S., Haas, H.L., Brown, R.E. 2002. Selective excitation of GABAergic neurons in the substantia nigra of the rat by orexin/hypocretin *in vitro*. *Regul. Pept.*, 104 (1-3) : 83 - 89.
- [300] Kosicek, M., Malnar, M., Goate, A., Hecimovic, S. 2010. Cholesterol accumulation in Niemann Pick type C (NPC) model cells causes a shift in APP localization to lipid rafts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 393 (3) : 404 – 409.
- [301] Kounnas, M. Z., Danks, A. M., Cheng, S., Tyree, C., Ackerman, E., Zhang, X., Ahn, K., Nguyen, P., Comer, D., Mao, L., Yu, C., Pleynt, D., Digregorio, P.J., Velicelebi, G., Stauderman, K.A., Comer, W.T., Mobley, W.C., Li, Y.-M., Sisodia, S.S., Tanzi, R.E., Wagner, S.L. 2010. Modulation of  $\gamma$ -Secretase Reduces  $\beta$ -Amyloid Deposition in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neuron*, 67 : 769 – 780.

- [302] Kojro, E., Fahrenholz, F. 2005. The non-amyloidogenic pathway: structure and function of alpha-secretases. *Subcell. Biochem.*, 38 : 105 - 127.
- [303] Kubota, D., Colgin, L.L., Casale, M., Brucher, F.A., Lynch, G. 2003. Endogenous waves in hippocampal slices. *J. Neurophysiol.*, 89 (1) : 81-89.
- [304] Kukar, T. L. Ladd, T.B., Bann, M.A., Fraering, P.C., Narlawar, R., Maharvi, G.M., Healy, B., Chapman, R., Welzel, A.T., Price, R.W., Moore, B., Rangachari, V., Cusack, B., Eriksen, J., Jansen-West, K., Verbeeck, C., Yager, D., Eckman, C., Ye, W., Sagi, S., Cottrell, B.A., Torpey, J., Rosenberry, T.L., Fauq, A., Wolfe, M.S., Schmidt, B., Walsh, D.M., Koo, E.H., Golde, T.E. 2008. Substrate-targeting  $\gamma$ -secretase modulators. *Nature*, 453: 925 – 929.
- [305] Kuo, Y.P., Xu, L., Eaton, J.B., Zhao, L., Wu, J., Lukas, R.J. 2005. Roles for nicotinic acetylcholine receptor subunit large cytoplasmic loop sequences in receptor expression and function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 314: 455 – 466.
- [306] Kuret, J., Congdon, E.E., Li, G., Yin, H., Yu, X., Zhong, Q. 2005. Evaluating triggers and enhancers of tau fibrillization. *Microsc. Res. Tech.*, 67 : 141 - 155.
- [307] Lacaille, J.C., Williams, S. 1990. Membrane properties of interneurons in stratum *oriens-alveus* of the CA1 region of rat hippocampus *in vitro*. *Neuroscience*, 36: 349 – 359.
- [308] LaFerla, F. M. 2002. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in alzheimer's disease. *Nature Rev. Neuroscience*, 3 : 862 – 872.
- [309] Laird, F.M., Cai, H., Savonenko, A.V., Farah, M.H., He, K., Melnikova, T., Wen, H., Chiang, H.C., Xu, G., Koliatsos, V.E., Borchelt, D.R., Price, D.L., Lee, H.K., Wong, P.C. 2005. BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J. Neurosci.*, 25 : 11693 - 11709.
- [310] Lamas, J.A., Reboreda, A., Codesido, V. 2002. Ionic basis of the resting membrane potential in cultured rat sympathetic neurons. *Neuroreport*, 13 (5) : 585 – 591.
- [311] Lamas, J.A. 2005. Evolución del concepto de potencial de reposo neuronal. Aspectos básicos y clínicos. *Rev. Neurol.*, 41 (9) : 538 – 549.
- [312] Lange, W., Geissendörfer, J., Schenzer, A., Grötzinger, J., Seeböhm, G., Friedrich, T., Schwake, M. 2009. Refinement of the binding site and mode of action of the anticonvulsant Retigabine on KCNQ K<sup>+</sup> channels. *Mol. Pharmacol.*, 75 (2) : 272 - 280.
- [313] Langmead, C.J., Watson, J., Reavill, C. 2008. Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. *Pharmacol Ther.*, 117 (2) :232 - 243.
- [314] Lannfelt, L., Blennow, K., Zetterberg, H., Batsman, S., Ames, D., Harrison, J., Masters, C.L., Targum, S., Bush, A.I., Murdoch, R., Wilson, J., Ritchie, C.W. 2008. Safety, efficacy, and biomarker findings of PBT2 in targeting A $\beta$  as a modifying therapy for Alzheimer's disease: a phase IIa, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.*, 7 : 779 - 786.

- [315] Lauren, J., Gimbel, D.A., Nygaard, H.B., Gilbert, J.W., Strittmatter, S.M. 2009. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature*, 457 : 1128 -1132.
- [316] Lazarov, O., Robinson, J., Tang, Y.P., Hairston, I.S., Korade-Mirnic, Z., Lee, V.M., Hersh, L.B., Sapolsky, R.M., Mirnic, K., Sisodia, S.S. 2005. Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell*, 120 (5) : 701 - 713.
- [317] Le Corre, S., Klafki, H.W., Plesnila, N., Hübinger, G., Obermeier, A., Sahagún, H., Monse, B., Seneci, P., Lewis, J., Eriksen, J., Zehr, C., Yue, M., McGowan, E., Dickson, D.W., Hutton, M., Roder, H.M. 2006. An inhibitor of tau hyperphosphorylation prevents severe motor impairments in tau transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103 : 9673 – 9678.
- [318] Leão, R.N., Tan, H.M., Fisahn, A. 2009. Kv7/KCNQ channels control action potential phasing of pyramidal neurons during hippocampal gamma oscillations *in vitro*. *J. Neurosci.*, 29 (42) : 13353 - 13364.
- [319] Leão, R.N., Colom, L.V., Borgius, L., Kiehn, O., Fisahn, A. 2011. Medial septal dysfunction by A $\beta$ -induced KCNQ channel-block in glutamatergic neurons. *Neurobiol. Aging*, [Epub ahead of print]
- [320] Lee, E.B., Leng, L.Z., Zhang, B., Kwong, L., Trojanowski, J.Q., Abel, T., Lee, V.M. 2006. Targeting amyloid-beta peptide (Abeta) oligomers by passive immunization with a conformation-selective monoclonal antibody improves learning and memory in Abeta precursor protein (APP) transgenic mice. *J. Biol. Chem.*, 281 (7) : 4292 - 4299.
- [321] Leissring, M.A., Farris, W., Chang, A.Y., Walsh, D.M., Wu, X., Sun, X., Frosch, M.P., Selkoe, D.J. 2003. Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron*, 40 : 1087 – 1093.
- [322] Lenz, R.A., Garimella, T., Dutta, S., Locke, C., Baker, J.D., Wesnes, K., Maruff, P., Abi-Saab, W.M., Saltarelli, M.D. 2009. ABT-089 demonstrates efficacy in a human model of cognition and good tolerability in subjects with Alzheimer's disease taking acetylcholinesterase inhibitors. *Alzheimer Dement.*, 5 (4Suppl1) : S157.
- [323] Lerche, C., Scherer, C.R., Seeböhm, G., Derst, C., Wei, A.D., Busch, A.E., Steinmeyer, K. 2000. Molecular cloning and functional expression of KCNQ5, a potassium channel subunit that may contribute to neuronal M-current diversity. *J. Biol. Chem.*, 275 : 22395 – 22400.
- [324] Leroy, K., Yilmaz, Z., Brion, J. P. 2007. Increased level of active GSK-3 $\beta$  in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 33: 43 - 55.
- [325] Lester, H. A., Dibas, M. I., Dahan, D. S., Leite, J. F., Dougherty, D. A. 2004. Cys-loop receptors: new twists and turns. *Trends Neurosci.*, 27: 329 – 336.

- [326] Letenneur, L., Péré, K., Fleury, H., Garrigue, I., Barberger-Gateau, P., Helmer, C., Orgogozo, J.-M., Gauthier, S., Dartigues, J.-F. 2008. Seropositivity to Herpes Simplex Virus Antibodies and Risk of Alzheimer's Disease: A Population-Based Cohort Study. *PLoS One*, 3(11): e3637
- [327] Leuchtenberger, S., Beher, D., Weggen, S. 2006. Selective modulation of A $\beta$ 42 production in Alzheimer's disease: non-steroidal anti-inflammatory drugs and beyond. *Curr. Pharm. Des.*, 12 : 1–19.
- [328] Lewis, C.A., Faber, D.S. 1996. Giant, TTX-insensitive, inhibitory postsynaptic currents in cultured rat spinal cord and medullary neurons. *J. Neurophysiol.*, 76 (5) : 3341- 3350.
- [329] Lewczuk, P., Kornhuber, J. 2011. Neurochemical dementia diagnostics in Alzheimer's disease: where are we now and where are we going? *Expert. Rev. Proteomics*, 8 (4) : 447 - 458.
- [330] Li, Y., Gamper, N., Shapiro, M. S. 2004. Single-channel analysis of KCNQ K<sup>+</sup> channels reveals the mechanism of augmentation by a cysteine-modifying reagent. *J. Neurosci.*, 24: 5079–5090.
- [331] Li, Y., Gamper, N., Hilgemann, D.W., Shapiro, M. S. 2005. Regulation of Kv7 (KCNQ) K<sup>+</sup> Channel Open Probability by Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate. *J. Neurosci.*, 25 (43): 9825 – 9835.
- [332] Li, T., Wen, H., Brayton, C., Das, P., Smithson, L.A., Fauq, A., Fan, X., Crain, B.J., Price, D.L., Golde, T.E., Eberhart, C.G., Wong, P.C. 2007. Epidermal growth factor receptor and notch pathways participate in the tumor suppressor function of gamma-secretase. *J. Biol. Chem.*, 282 (44) : 32264 - 32273.
- [333] Lichtenthaler, S.F., Haass, C. 2004. Amyloid at the cutting edge: activation of  $\alpha$ -secretase prevents amyloidogenesis in an Alzheimer disease mouse model. *J. Clin. Invest.*, 113 (10): 1384 – 1386.
- [334] Lin, W. R., Wozniak, M. A., Esiri, M. M., Klenerman, P., Itzhaki, R. F. 2001. Herpes simplex encephalitis: involvement of apolipoprotein E genotype. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 70 : 117 - 119.
- [335] Lin, W. R., Wozniak, M. A., Wilcock, G. K., Itzhaki, R. F. 2002. Citomegalovirus is Present in a very High Proportion of Brains from Vascular Dementia Patients. *Neurobiol. Dis.*, 9 : 82 – 87.
- [336] Lin, H., Vicini, S., Hsu, F.C., Doshi, S., Takano, H., Coulter, D.A., Lynch, D.R. 2010. Axonal  $\alpha$ 7 nicotinic ACh receptors modulate presynaptic NMDA receptor expression and structural plasticity of glutamatergic presynaptic boutons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107 (38) : 16661 - 16666.

- [337] Lindsley, S.R., Moore, K.P., Rajapakse, H.A., Selnick, H.G., Young, M.B., Zhu, H., Munshi, S., Kuo, L., McGaughey, G.B., Colussi, D., Crouthamel, M.C., Lai, M.T., Pietrak, B., Price, E.A., Sankaranarayanan, S., Simon, A.J., Seabrook, G.R., Hazuda, D.J., Pudvah, N.T., Hochman, J.H., Graham, S.L., Vacca, J.P., Nantermet, P.G. 2007. Design, synthesis, and SAR of macrocyclic tertiary carbinamine BACE-1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17 : 4057 – 4061.
- [338] Liskowsky, W., Schliebs, R. 2006. Muscarinic acetylcholine receptor inhibition in transgenic Alzheimer-like Tg2576 mice by scopolamine favours the amyloidogenic route of processing of amyloid precursor protein. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 24 : 149 – 156.
- [339] Lister, J.P., Barnes, C.A., 2009. Neurobiological Changes in the Hippocampus During Normative Aging. *Arch. Neurol.*, 66 (7): 829 - 833.
- [340] Lleó, A., Berezovska, O., Herl, L., Raju, S., Deng, A., Bacskai, B.J., Frosch, M.P., Irizarry, M., Hyman, B.T. 2004. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs lower Abeta42 and change presenilin 1 conformation. *Nat Med.*, 10 : 1065 - 1066.
- [341] Lleó, A., Greenberg, S.M., Growdon, J.H. 2006. Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Med.*, 57 : 513 – 533.
- [342] Lleó, A. 2008. Activity of gamma-secretase on substrates other than APP. *Curr. Top. Med. Chem.*, 8 : 9 - 16.
- [343] Llewellyn, D.J., Lang, I.A., Matthews, F.E., Plassman, B.L., Rogers, M., Morgenstern, L.B., Fisher, G.G., Kabeto, M.U., Langa, K.M. 2010. Vascular health, diabetes, APOE and dementia: the Aging, Demographics, and Memory Study. *Alzheimers Res. Ther.*, 2 (19) : 1 – 8.
- [344] Lofwall, M.R., Griffiths, R.R., Mintzer, M.Z. 2006. Cognitive and subjective acute dose effects of intramuscular ketamine in healthy adults. *Exp. Clin. Psychopharmacol.*, 14 (4) : 439 - 449.
- [345] Lopes da Silva, F.H., Witter, M.P., Boeijinga, P.H., Lohman, A.H. 1990. Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. *Physiol Rev.*, 70: 453–511.
- [346] López-García, J.A., King, A.E., 1994. Membrane properties of physiologically classified rat dorsal horn neurons *in vitro*: correlation with cutaneous sensory afferent input. *Eur. J. Neurosci.*, 6: 998-1007.
- [347] Lorente de Nó, R. 1934. Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psicol. Neurol.*, 46 : 113 – 177.
- [348] Lundkvist, J., Näslund, J. 2007. Gamma-secretase: a complex target for Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 7 (1) : 112 - 118.
- [349] Lüthi, A., McCormick, D.A. 1998. H-current: properties of a neuronal and network pacemaker. *Neuron*, 21 (1) : 9 - 12.
- [350] Lynch, M.A. 2004. Long-term potentiation and memory. *Physiol. Rev.*, 84: 87–136.

- [351] Ma, H., Lesné, S., Kotilinek, L., Steidl-Nichols, J.V., Sherman, M., Younkin, L., Younkin, S., Forster, C., Sergeant, N., Delacourte, A., Vassar, R., Citron, M., Kofuji, P., Boland, L.M., Ashe, K.H. 2007. Involvement of beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) in amyloid precursor protein-mediated enhancement of memory and activity-dependent synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104 (19) : 8167- 8172.
- [352] MacKinnon, R., 2003. Potassium channels. *FEBS Lett.*, 555: 62-65.
- [353] Madison, D., Nicoll, R.A. 1984. Control of the repetitive discharge of rat CA1 pyramidal neurons *in vitro*. *J. Physiol.*, 354 : 319 – 331.
- [354] Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., Huang, Y. 2006. Apolipoprotein E4: A causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103 (15) : 5644 - 5651.
- [355] Majercak, J., Ray, W.J., Espeseth, A., Simon, A., Shi, X.P., Wolffe, C., Getty, K., Marine, S., Stec, E., Ferrer, M., Strulovici, B., Bartz, S., Gates, A., Xu, M., Huang, Q., Ma, L., Shughrue, P., Burchard, J., Colussi, D., Pietrak, B., Kahana, J., Beher, D., Rosahl, T., Shearman, M., Hazuda, D., Sachs, A.B., Koblan, K.S., Seabrook, G.R., Stone, D.J. 2006. LRRTM3 promotes processing of amyloid precursor protein by BACE1 and is a positional candidate gene for late-onset Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103 : 17967 – 17972 .
- [356] Maljevic, S., Lerche, C., Seeböhm, G., Alekov, A.K., Busch, A.E., Lerche, H. 2003. C-terminal interaction of KCNQ2 and KCNQ3 K<sup>+</sup> channels. *J. Physiol.*, 548 : 353 – 360.
- [357] Maljevic, S., Wuttke, T.V., Lerche, H. 2008. Nervous system Kv7 disorders: breakdown of a subthreshold brake. *J. Physiol.*, 586 (7) : 1791 - 1801.
- [358] Maljevic, S., Wuttke, T.V., Seeböhm, G., Lerche, H. 2010. KV7 channelopathies. *Pflugers Arch.*, 460 (2) : 277 - 288.
- [359] Marchesi, V.T. 2011. Alzheimer's dementia begins as a disease of small blood vessels, damaged by oxidative induced inflammation and dysregulated amyloid metabolism: implications for early detection and therapy. *FASEB J.*, 25 : 5 -13.
- [360] Marchi, M., Risso, F., Viola, C., Cavazzani, P., Raiteri, M. 2002. Direct evidence that release-stimulating  $\alpha 7^*$  nicotinic cholinergic receptors are localized on human and rat brain glutamatergic axon terminals. *J. Neurochem.*, 80 (6) : 1071 - 1078.
- [361] Marco, J .L. 2002. Inhibidores Clásicos y Nuevos de Inhibidores de la Acetilcolinesterasa para tratar la Enfermedad de Alzheimer. En: García, G. A., Gandía, L. eds Fronteras en la Enfermedad de Alzheimer. Madrid. p 141 – 156.
- [362] Marrion, N. V. 1997. Control of M-current. *Annu. Rev. Physiol.*, 59: 488–504.



- [363] Martire, M., Castaldo, P., D'Amico, M., Preziosi, P., Annunziato, L., Taglialatela, M. J. 2004. M channels containing KCNQ2 subunits modulate norepinephrine, aspartate, and GABA release from hippocampal nerve terminals. *Neurosci.*, 24 (3) : 592 - 597.
- [364] Martire, M., D'Amico, M., Panza, E., Miceli, F., Viggiano, D., Lavergata, F., Iannotti, F.A., Barrese, V., Preziosi, P., Annunziato, L., Taglialatela, M. 2007. Involvement of KCNQ2 subunits in [3H]dopamine release triggered by depolarization and pre-synaptic muscarinic receptor activation from rat striatal synaptosomes. *J. Neurochem.*, 102 (1) : 179 - 193.
- [365] Martone, R.L., Zhou, H., Atchison, K., Comery, T., Xu, J.Z., Huang, X., Gong, X., Jin, M., Kreft, A., Harrison, B., Mayer, S.C., Aschmies, S., Gonzales, C., Zaleska, M.M., Riddell, D.R., Wagner, E., Lu, P., Sun, S.C., Sonnenberg-Reines, J., Oganessian, A., Adkins, K., Leach, M.W., Clarke, D.W., Huryn, D., Abou-Gharbia, M., Magolda, R., Bard, J., Frick, G., Raje, S., Forlow, S.B., Balliet, C., Burczynski, M.E., Reinhart, P.H., Wan, H.I., Pangalos, M.N., Jacobsen, J.S. 2009. Begacestat (GSI-953): a novel, selective thiophene sulfonamide inhibitor of amyloid precursor protein gamma-secretase for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 331 (2) : 598 - 608.
- [366] Maruyama, T., Kanaji, T., Nakade, S., Kanno, T., Mikoshiba, K. 1997. 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane penetrable modulator of Ins (1,4,5) P<sub>3</sub> - induced Ca<sup>2+</sup> release. *J. Biochem. (Tokyo)*, 122 (3) : 498 - 505.
- [367] Masukawa, L.M., Benardo, L.S., Prince, D.A. 1982. Variations in electrophysiological properties of hippocampal neurons in different subfields. *Brain Res.*, 242 (2) : 341 - 344.
- [368] Matsuoka, Y., Jouroukhin, Y., Gray, A.J., Ma, L., Hirata-Fukae, C., Li, H.F., Feng, L., Lecanu, L., Walker, B.R., Planel, E., Arancio, O., Gozes, I., Aisen, P.S. 2008. A neuronal microtubule-interacting agent, NAPVSIPOQ, reduces tau pathology and enhances cognitive function in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 325 (1) : 146 - 153.
- [369] Mattson, M.P. 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, 430 (7000): 631 - 639.
- [370] May, L.T., Leach, K., Sexton, P.M., Christopoulos, A. 2007. Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 47 : 1 - 51.
- [371] Mayeux, R. 2008. Alzheimer's disease: epidemiology. En: Duyckaerts, C., Litvan, I. eds Dementias: Handbook of Clinical Neurology. Amsterdam. p 195 - 205.
- [372] Mazanetz, M.P., Fischer, P.M. 2007. Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 6 : 464 - 479.
- [373] McConlogue, L., Buttini, M., Anderson, J.P., Brigham, E.F., Chen, K.S., Freedman, S.B., Games, D., Johnson-Wood, K., Lee, M., Zeller, M., Liu, W., Motter, R., Sinha, S. 2007. Partial reduction of BACE1 has dramatic effects on Alzheimer plaque and synaptic pathology in APP Transgenic Mice. *J. Biol. Chem.*, 282 (36) :26326 - 26334.

- [374] McCormick, D.A., Prince, D.A. 1986. Pirenzepine discriminates among ionic responses to acetylcholine in guinea-pig cerebral cortex and reticular nucleus of thalamus. *TIPS*, (February Suppl): 72 – 77.
- [375] McCormick, D.A. 2004. Membrane potential and action potential. En: Byrne, J. H., Roberts, J. L. A. eds. *From Molecules to Networks. An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience*. California. p 115 – 140.
- [376] McGeer, P.L., Rogers, J., McGeer, E.G. 2006. Inflammation, anti-inflammatory agents and Alzheimer disease: The last 12 years. *J. Alzheimers Dis.*, 9: 271 – 276.
- [377] McGeer, P.L.; McGeer, E. 2007. NSAIDs and Alzheimer's disease: epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiol. Aging*, 28: 639 – 647.
- [378] McGowan, E., Pickford, F., Kim, J., Onstead, L., Eriksen, J., Yu, C., Skipper, L., Murphy, M.P., Beard, J., Das, P., Jansen, K., Delucia, M., Lin, W.L., Dolios, G., Wang, R., Eckman, C.B., Dickson, D.W., Hutton, M., Hardy, J., Golde, T. 2005. Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. *Neuron*, 47 (2) : 191 - 199.
- [379] McGowan, E., Eriksen, J., Hutton, M. 2006. A decade of modelling Alzheimer's disease in transgenic mice. *Trends Genet.*, 22: 281 – 289.
- [380] McGuinness, B., O'Hare, J., Craig, D., Bullock, R., Malouf, R., Passmore, P. 2010. Statins for the treatment of dementia. *Cochrane Database Syst. Rev.*, (8):CD007514.
- [381] McLaurin, J., Kierstead, M.E., Brown, M.E., Hawkes, C.A., Lambermon, M.H., Phinney, A.L., Darabie, A.A., Cousins, J.E., French, J.E., Lan, M.F., Chen, F., Wong, S.S., Mount, H.T., Fraser, P.E., Westaway, D., St George-Hyslop, P. 2006. Cyclohexanehexol inhibitors of Abeta aggregation prevent and reverse Alzheimer phenotype in a mouse model. *Nat. Med.*, 12 (7) : 801 - 808.
- [382] Mena, A. 1996. Electrophysiological and Morphological Characterization of Medial Entorhinal Cortex Layer III Neurons. [Tesis Máster] Montreal, Canada.
- [383] Mendes, C.T., Mury, F.B., de Sá Moreira, E., Alberto, F.L., Forlenza, O.V., Dias-Neto, E., Gattaz, W.F. 2009. Lithium reduces Gsk3b mRNA levels: implications for Alzheimer Disease. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, 259 (1) : 16 - 22.
- [384] Mesulam, M. 2004. The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: pivotal factor or side show? *Learn Mem.*, 11 (1) : 43 -49.
- [385] Miceli, F., Soldovieri, M.V., Martire, M., Tagliatela, M. 2008. Molecular pharmacology and therapeutic potential of neuronal Kv7-modulating drugs. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 8 (1) : 65 - 74.
- [386] Micheletti, R., Schiavone, A. 1990. Functional determination of McN-A-343 affinity for M1 muscarinic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 253 (1): 310-314.

- [387] Mikiciuk-Olasik, E., Szymański, P., Żurek, E. 2007. Diagnostics and therapy of Alzheimer's disease. *Indian J. Exp. Biol.*, 45 : 315 – 325.
- [388] Millar, N.S., Gotti, C. 2009. Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, 56 (1) :237 - 246.
- [389] Miller, C., 2000. An overview of the potassium channel family. *Genome Biol.*, 1: RVS4.1-RVS4.5.
- [390] Miners, J.S., Baig, S., Tayler, H., Kehoe, P.G., Love, S., 2009. Neprilysin and Insulin-Degrading Enzyme Levels Are Increased in Alzheimer Disease in Relation to Disease Severity. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 68 (8) : 902 – 914.
- [391] Mohandas, E., Rajmoha, V., Raghunath, B. 2009. Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian J. Psychiatry*, 51 (1) : 55 – 61.
- [392] Morgan, M.J., Kim, Y.S., Liu, Z.G. 2007. Lipid rafts and oxidative stress induced cell death. *Antioxid. Redox Sign.*, 9: 1471–1484.
- [393] Mori, C., Spooner, E.T., Wisniewsk, K.E., Wisniewski, T.M., Yamaguch, H., Saido, T.C., Tolan, D.R., Selkoe, D.J., Lemere, C.A. 2002. Intraneuronal Abeta42 accumulation in Down syndrome brain. *Amyloid*, 9 (2) : 88 - 102.
- [394] Moser, S.L., Harron, S.A., Crack, J., Fawcett, J.P., Cowley, E.A. 2008. Multiple KCNQ potassium channel subtypes mediate basal anion secretion from the human airway epithelial cell line Calu-3. *J. Membr. Biol.*, 221 (3):153 - 163.
- [395] Moulder, K.L., Cormier R.J., Shute, A.A., Zorumski, C.F., Mennerick, S. 2003. Homeostatic effects of depolarization on Ca<sup>2+</sup> influx, synaptic signaling, and survival. *J. Neurosci.*, 23 (5) : 1825 - 1831.
- [396] Naj, A.C., Jun, G., Beecham, G.W., Wang, L-S., Vardarajan, B.N., Buross, J., Gallins, P.J., Buxbaum, J.D., Jarvik, G. P., Crane, P.K. y cols. 2011. Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat. Genet.*, 43 (5) : 436 - 441.
- [397] Nakajo, K., Kubo, Y. 2005. Protein kinase C shifts the voltage dependence of KCNQ/M channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.*, 569 (1): 59 – 74.
- [398] Narahashi, T. 1972. Mechanism of action of tetrodotoxin and saxitoxin on excitable membranes. *Fed. Proc.*, 31 (3) : 1124 - 1132.
- [399] Nashmi, R., Lester, H.A. 2006. CNS localization of neuronal nicotinic receptors. *J. Mol. Neurosci.*, 30 : 181 – 184.
- [400] Navarro, L. J. 2004. Control de los Movimientos Oculares: Mecanismos de Integración a Nivel del Tallo Encefálico. [Tesis Doctoral] Sevilla, España.

- [401] Navarro, A., Boveris, A. 2007. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 292: 670 – 686.
- [402] Ndountse, L.T., Chan, H.M. 2009. Role of N-methyl-D-aspartate receptors in polychlorinated biphenyl mediated neurotoxicity. *Toxicol. Lett.*, 184 : 50 –55.
- [403] Neafsey, E.J., Collins, M.A. 2011. Moderate alcohol consumption and cognitive risk. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, 7 : 465 - 484.
- [404] Neer, E. J. 1995. Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell*, 80 : 249–257.
- [405] Nelson, D. L., Cox, M. M. 2004. Biological Membranes and Transport. En: Freeman, W. H. eds. *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York . p 411 – 417.
- [406] Nieuwenhuys, R., Voogd, J., Van Huijzen, C. 2008. Telencephalon: Hippocampus and Related Structures. En: Springer Verlag Berlin Heidelberg. eds. *The Human Central Nervous System*. Nueva York. p 361 – 399.
- [407] Nicoll, R.A., Alger, B.E. 1981. A simple chamber for recording from submerged brain slices. *J. Neurosci. Meth.*, 4 (2) : 153 - 156.
- [408] Nimmrich, V., Grimm, C., Draguhn, A., Barghorn, S., Lehmann, A., Schoemaker, H., Hillen, H., Gross, G., Ebert, U., Bruehl, C. 2008. Amyloid beta oligomers (A beta<sub>(1-42)</sub>) globulomer) suppress spontaneous synaptic activity by inhibition of P/Q-type calcium currents. *J. Neurosci.*, 28 (4) : 788 - 797.
- [409] Nishitomi, K., Sakaguchi, G., Horikoshi, Y., Gray, A.J., Maeda, M., Hirata-Fukae, C., Becker, A.G., Hosono, M., Sakaguchi, I., Minami, S.S., Nakajima, Y., Li, H.F., Takeyama, C., Kihara, T., Ota, A., Wong, P.C., Aisen, P.S., Kato, A., Kinoshita, N., Matsuoka, Y. 2006. BACE1 inhibition reduces endogenous Abeta and alters APP processing in wild-type mice. *J. Neurochem.*, 99 (6) : 1555 - 1563.
- [410] Nixon, R.A. 2007. Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J. Cell. Sci.*, 120 (Pt 23) : 4081 - 4091.
- [411] Noble, W., Planel, E., Zehr, C., Olm, V., Meyerson, J., Suleman, F., Gaynor, K., Wang, L., LaFrancois, J., Feinstein, B., Burns, M., Krishnamurthy, P., Wen, Y., Bhat, R., Lewis, J., Dickson, D., Duff, K. 2005. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102 : 6990 – 6995.
- [412] Nordberg, A. 1994. Human Nicotinic Receptors Their role in Ageing and Dementia. *Neurochem. Int.*, 25 (1): 93 - 97.
- [413] Núñez, A., Rodrigo-Angulo, M.L., De Andrés, I. y Reinoso-Suárez, F. 2002. Firing activity and postsynaptic properties of morphologically identified neurons of ventral oral pontine reticular nucleus. *Neuroscience*, 115 (4) : 1165 - 1175.

- [414] Nunomura, A., Castellani, R.J., Zhu, X., Moreira, P.I., Perry, G., Smith, M.A. 2006. Involvement of Oxidative Stress in Alzheimer Disease. *J. Neuropathol Exp Neurol.*, 65 (7) : 631 – 641.
- [415] Oddo, S., Vasilevko, V., Caccamo, A., Kitazawa, M., Cribbs, D. H., LaFerla, F. M. 2006. Reduction of soluble A $\beta$  and tau, but not soluble A $\beta$  alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles. *J. Biol. Chem.*, 281 : 39413 - 39423.
- [416] Ohkawara, T., Nagase, H., Koh, C.S., Nakayama, K. 2011. The amyloid precursor protein intracellular domain alters gene expression and induces neuron-specific apoptosis. *Gene*, 475 (1) : 1 - 9.
- [417] Ohno, M., Chang, L., Tseng, W., Oakley, H., Citron, M., Klein, W.L., Vassar, R., Disterhoft, J.F. 2006. Temporal memory deficits in Alzheimer's mouse models: rescue by genetic deletion of BACE1. *Eur. J. Neurosci.*, 23 (1) : 251-260.
- [418] Ohno, M., Cole, S.L., Yasvoina, M., Zhao, J., Citron, M., Berry, R., Disterhoft, J.F., Vassar, R. 2007. BACE1 gene deletion prevents neuron loss and memory deficits in 5XFAD APP/PS1 transgenic mic. *Neurobiol. Dis.*, 26 (1) : 134 – 145.
- [419] Origlia, N., Kuczewski, N., Aztiria, E., Gautam, D., Wess, J., Domenici, L. 2006. Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice show distinct synaptic plasticity impairments in the visual cortex. *J. Physiol.*, 577 : 829 - 840.
- [420] Origlia, N., Righi, M., Capsoni, S., Cattaneo, A., Fang, F., Stern, D.M., Chen, J.X., Schmidt, A.M., Arancio, O., Yan, S.D., Domenici, L. 2008. Receptor for advanced glycation end product-dependent activation of p38 mitogen-activated protein kinase contributes to amyloid-beta-mediated cortical synaptic dysfunction. *J. Neurosci.*, 28 (13) : 3521 - 3530.
- [421] Padala, K.P., Potter, J.F., Ikezu, T. 2009. HMGCoA-Reductase Inhibitors in Dementia: Benefit or Harm (Review). *Clin. Med. Geriatr.*, 3: 13 – 22.
- [422] Padilla, P., Górriz, J.M., Ramírez, J., Lang, E.W., Chaves, R., Segovia, F., López, M., Salas - González, D., Álvarez, I. 2010. Analysis of SPECT brain images for the diagnosis of Alzheimer's disease based on NMF for feature extraction. *Neurosci. Lett.*, 479 (3) : 192 – 196.
- [423] Pákási, M., Kálmán, J. 2008. Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.*, 53 (5) : 103 - 111.
- [424] Pan, Z., Kao, T., Horvath, Z., Lemos, J., Sul, J.Y., Cranstoun, S.D., Bennett, V., Scherer, S.S., Cooper, E.C. 2006. A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and NaV channels at electrically active domains of the axon. *J. Neurosci.*, 26 (10) : 2599 - 2613.
- [425] Panza, F., Solfrizzi, V., Frisardi, V., Imbimbo, B.P., Capurso, C., D'Introno, A., Colacicco, A.M., Seripa, D., Vendemiale, G., Capurso, A., Pilotto, A. 2009. Beyond the neurotransmitter-focused approach in treating Alzheimer's disease: drugs targeting beta-amyloid and tau protein. *Aging Clin. Exp. Res.*, 21 (6) : 386 - 406.

- [426] Papa, M., Bosnia, F., Canitano, A., Castaldo, P., Sellitti, S., Annunziato, L., Tagliatela, M. 2003. Expression pattern of the ether-a-gogo-related (ERG) K<sup>+</sup> channel-encoding genes ERG1, ERG2, and ERG3 in the adult rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, 466 : 119 – 135.
- [427] Papez, J. W. 1937. A proposed mechanism of emotion. *Arch. Neurol. Psychiatry.*, 38: 725 – 743.
- [428] Park, K., Yang, J., Seikel, E., Trimmer, J. 2008. Potassium Channel Phosphorylation in Excitable Cells: Providing Dynamic Functional Variability to a Diverse Family of Ion Channels. *Physiology*, 23: 49 - 57.
- [429] Parameshwaran, K., Dhanasekaran, M., Suppiramaniam, V. 2008. Amyloid beta peptides and glutamatergic synaptic dysregulation. *Exp. Neurol.*, 210 : 7 – 13.
- [430] Parnetti L, Mignini F, Tomassoni D, Traini E, Amenta F. 2007. Cholinergic precursors in the treatment of cognitive impairment of vascular origin: ineffective approaches or need for re-evaluation? *J. Neurol. Sci.*, 257 (1-2) : 264 - 269.
- [431] Parra, P., Gulyás, A.I., Miles, R. 1998. How many subtypes of inhibitory cells in the hippocampus? *Neuron*, 20 : 983 – 993.
- [432] Pasternak, S.H., Callahan, J.W., Mahuran, D.J. 2004. The role of the endosomal/lysosomal system in amyloid-beta production and the pathophysiology of Alzheimer's disease: reexamining the spatial paradox from a lysosomal perspective. *J. Alzheimers Dis.*, 6 (1): 53 - 65.
- [433] Paxinos, G., Watson, C. 2004. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press. eds. Boston. p. 1 – 209.
- [434] Peña, F., Álvarez-Pérez, N. 2006. Epileptiform activity induced by pharmacologic reduction of M-currents in the developing hippocampus *in vitro*. *Epilepsia*, 47 (1): 47 - 54.
- [435] Peña, F., Gutiérrez-Lerma, A., Quiroz-Baez, R., Arias, C. 2006. The role of beta-amyloid protein in synaptic function: implications for Alzheimer's disease therapy. *Curr. Neuropharmacol.*, 4 (2) : 149 - 163.
- [436] Pepeu, G., Giovannini, M.G. 2009. Cholinesterase inhibitors and beyond. *Curr. Alzheimer. Res.*, 6 (2) : 86 - 96.
- [437] Peretto, I., Radaelli, S., Parini, C., Zandi, M., Raveglia, L.F., Dondio, G., Fontanella, L., Misiano, P., Bigogno, C., Rizzi, A., Riccardi, B., Biscailoli, M., Marchetti, S., Puccini, P., Catinella, S., Rondelli, I., Cenacchi, V., Bolzoni, P.T., Caruso, P., Villetti, G., Facchinetti, F., Del Giudice, E., Moretto, N., Imbimbo, B.P. 2005. Synthesis and biological activity of flurbiprofen analogues as selective inhibitors of beta amyloid (1)(-)(42) secretion. *J. Med. Chem.*, 48 : 5705 - 5720.
- [438] Peretto, I., La Porta, E. 2008. Gamma-secretase modulation and its promise for Alzheimer's disease: a medicinal chemistry perspective. *Curr. Top. Med. Chem.*, 8 (1) : 38 - 46.

- [439] Peretz, A., Degani, N., Nachman, R., Uziyel, Y., Gibor, G., Shabat, D., Attali, B. 2005. Meclofenamic acid and diclofenac, novel templates of KCNQ2/Q3 potassium channel openers, depress cortical neuron activity and exhibit anticonvulsant properties. *Mol. Pharmacol.*, 67 : 1053 – 1066.
- [440] Perry, E., Martin-Ruiz, C., Lee, M., Griffiths, M., Jonhson, M., Piggott, M., Haroutunian, V., Buxbaum, J. D., Nasland, J., Davis, K., Gotti, C., Clementi, F., Tzartos, S., Cohen, O., Soreq, H., Jaros, E., Perry, R., Ballard, C., McKeith, I., Court, J. 2000. Nicotinic Receptor subtypes in Human Brain Ageing, Alzheimer and Lewy body diseases. *Eur. J. Pharmacol.*, 393 : 215 – 222.
- [441] Peters, H.C., Hu, H., Pongs, O., Storm, J.F., Isbrandt, D. 2005. Conditional transgenic suppression of M channels in mouse brain reveals functions in neuronal excitability, resonance and behavior. *Nat. Neurosci.*, 8 (1): 51 – 60.
- [442] Petersen, R.C., Morris, J.C. 2005. Mild Cognitive Impairment as a Clinical Entity and Treatment Target. *Arch. Neurol.*, 62 :1160 – 1163.
- [443] Petersen, R.C., Parisi, J.E., Dickson, D.W., Johnson, K.A., Knopman, D.S., Boeve, B.F., Jicha, G.A., Ivnik, R.J., Smith, G.E., Tangalos, E.G., Braak, H., Kokmen, E. 2006. Neuropathologic features of amnesic mild cognitive impairment. *Arch. Neurol.*, 63 (5) : 665 - 672.
- [444] Phiel, C. J., Wilson, C. A., Lee, V. M., Klein, P. S. 2003. GSK-3 $\alpha$  regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature*, 423: 435 – 439.
- [445] Pickhardt, M., Larbig, G., Khlistunova, I., Coksezen, A., Meyer, B., Mandelkow, E.M., Schmidt, B., Mandelkow, E. 2007. Phenylthiazolyl-hydrazide and its derivatives are potent inhibitors of tau aggregation and toxicity *in vitro* and in cells. *Biochemistry*, 46 : 10016 – 10023.
- [446] Pinto, V., Derkach, V.A., Safronov, B.V. 2008. Role of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium channels in A $\delta$ - and C-fiber conduction and synaptic transmission. *J. Neurophysiol.*, 99 (2) : 617 - 628.
- [447] Podlogar, M., Dietrich, D. 2006. Firing pattern of rat hippocampal neurons: a perforated patch clamp study. *Brain Res.*, 1085 (1) : 95 - 101.
- [448] Pollack, S.J., Lewis, H. 2005.  $\gamma$ -Secretase inhibitors for Alzheimer's disease: challenges of a promiscuous protease. *Curr. Opin. Invest. Drugs*, 6 : 35 – 47.
- [449] Pollen, D.A., Baker, S., Hinerfeld, D., Swearer, J., Evans, B.A., Evans, J.E., Caselli, R., Rogaeva, E., St George-Hyslop, P., Moonis, M. 2010. Prevention of Alzheimer's disease in high risk groups: statin therapy in subjects with PSEN1 mutations or heterozygosity for apolipoprotein E  $\epsilon$ 4. *Alzheimers Res. Ther.*, 2 (31): 2 – 7.
- [450] Pomper, J.K., Wilhelm, H., Tayebati, S.K., Asmus, F., Schüle, R., Sievert, K.D., Haensch, C.A., Melms, A., Haarmeier, T. 2011. A novel clinical syndrome revealing a deficiency of the muscarinic M3 receptor. *Neurology*, 76 (5) : 451 - 455.

- [451] Popa, R.V., Pereira, E.F., Lopes, C., Maelicke, A., Albuquerque, E.X. 2006. The N-butylcarbamate derivative of galantamine acts as an allosteric potentiating ligand on  $\alpha 7$  nicotinic receptors in hippocampal neurons: clinical implications for treatment of Alzheimer's disease. *J. Mol. Neurosci.*, 30 (1-2) : 227 – 232.
- [452] Porta, S., Serra, S.A., Huch, M., Valverde, M.A., Llorens, F., Estivill, X., Arbonés, M.L., Martí, E. 2007. RCAN1 (DSCR1) increases neuronal susceptibility to oxidative stress: a potential pathogenic process in neurodegeneration. *Hum. Mol. Genet.*, 16: 1039–1050.
- [453] Potter, L.T. 2001. Snake toxins that bind specifically to individual subtypes of muscarinic receptors. *Life Sci.*, 68 (22-23) : 2541 - 2547.
- [454] Potter, P. E. 2010. Investigational medications for treatment of patients with Alzheimer Disease. *J. Am. Osteopath. Assoc.*, 110 (9 Suppl 8) : S27 - S36.
- [455] Poulin, B., Butcher, A., McWilliams, P., Bourgognon, J.M., Pawlak, R., Kong, K.C., Bottrill, A., Mistry, S., Wess, J., Rosethorne, E.M., Charlton, S.J., Tobin, A.B. 2010. The M3-muscarinic receptor regulates learning and memory in a receptor phosphorylation/arrestin-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107 (20) : 9440 - 9445.
- [456] Power, J. M., Sah, P. 2002. Nuclear calcium signaling evoked by cholinergic stimulation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci.*, 22 : 3454 – 3462.
- [457] Prat, C.M., Schmid, S., Farrugia, F., Cenac, N., Le Masson, G., Schwemmler, M., Gonzalez-Dunia, D. 2009. Mutation of the protein kinase C site in borna disease virus phosphoprotein abrogates viral interference with neuronal signaling and restores normal synaptic activity. *PLoS Pathog.*, 5 (5) : e1000425.
- [458] Prescott, S.A., De Koninck, Y. 2002. Four cell types with distinctive membrane properties and morphologies in lamina I of the spinal dorsal horn of the adult rat. *J. Physiol.*, 539 (Pt 3) : 817 - 836.
- [459] Prince, M., Jackson, J. 2009. World Alzheimer Report 2009. London: Alzheimer's Disease International (ADI), September 2009.
- [460] Prince, M., Bryce, R., Ferri, C. 2011. World Alzheimer Report 2011: The benefits of early diagnosis and intervention. London: Alzheimer's Disease International (ADI), September 2011.
- [461] Puzzo, D., Privitera, L., Leznik, E., Fà, M., Staniszewski, A., Palmeri, A., Arancio, O. 2008. Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J. Neurosci.*, 28 (53) : 14537 - 14545.
- [462] Puzzo, D., Staniszewski, A., Deng, S.X., Privitera, L., Leznik, E., Liu, S., Zhang, H., Feng, Y., Palmeri, A., Landry, D.W., Arancio, O. 2009. Phosphodiesterase 5 inhibition improves synaptic function, memory, and amyloid-beta load in an Alzheimer's disease mouse model. *J. Neurosci.*, 29 (25) : 8075 - 8086.



- [463] Racke, M. M., Boone, L.I., Hepburn, D.L., Parsadainian, M., Bryan, M.T., Ness, D.K., Pirooz, K.S., Jordan, W.H., Brown, D.D., Hoffman, W.P., Holtzman, D.M., Bales, K.R., Gitter, B.D., May, P.C., Paul, S.M., DeMattos, R.B. 2005. Exacerbation of cerebral amyloid angiopathy-associated microhemorrhage in amyloid precursor protein transgenic mice by immunotherapy is dependent on antibody recognition of deposited forms of amyloid  $\beta$ . *J. Neurosci.*, 25: 629 – 636.
- [464] Radtke, F., Wilson, A., Mancini, S.J., MacDonald, H.R. 2004a. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat. Immunol.*, 5 : 247 – 253.
- [465] Radtke, F., Wilson, A., MacDonald, H.R. 2004b. Notch signaling in T- and B-cell development. *Curr. Opin. Immunol.*, 16 : 174 – 179.
- [466] Rafii, M.S., Aisen, P.A. 2009. Recent developments in Alzheimer's disease therapeutics. *BMC Med.*, 7 (7): 1- 4.
- [467] Rahman, A. 2009. The role of adenosine in Alzheimer's disease. *Curr. Neuropharmacol.*, 7 (3) : 207 - 216.
- [468] Rajendran, L., Schneider, A., Schlechtingen, G., Weidlich, S., Ries, J., Braxmeier, T., Schwill, P., Schulz, J.B., Schroeder, C., Simons, M., Jennings, G., Knölker, H.J., Simons, K. 2008. Efficient inhibition of the Alzheimer's disease beta-secretase by membrane targeting. *Science*, 320 (5875) : 520 - 523.
- [469] Rasmussen, H.B., Frøkjær-Jensen, C., Jensen, C.S., Jensen, H.S., Jørgensen, N.K., Misonou, H., Trimmer, J.S., Olesen, S.P., Schmitt, N. 2007. Requirement of subunit co-assembly and ankyrin-G for M-channel localization at the axon initial segment. *J. Cell. Sci.*, 120 (Pt 6) : 953 - 963.
- [470] Reitz, C., Brayne, C., Mayeux, R. 2011. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.*, 7 (3) : 137 - 152.
- [471] Ren, X.Q., Cheng, S.B., Treuil, M.W., Mukherjee, J., Rao, J., Braunewell, K. H., Lindstrom, J. M., Anand, R. 2005. Structural determinants of  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptor trafficking. *J. Neurosci.*, 25: 6676 – 6686.
- [472] Ren, K., King, M.A., Liu, J., Siemann, J., Altman, M., Meyers, C., Hughes, J.A., Meyer, E.M. 2007. The  $\alpha 7$  nicotinic receptor agonist 4OH-GTS-21 protects axotomized septohippocampal cholinergic neurons in wild type but not amyloid-overexpressing transgenic mice. *Neuroscience*, 148 (1) : 230 - 237.
- [473] Ringman, J.M., Cummings, J.L. 2006. Current and emerging pharmacological treatment options for dementia. *Behav. Neurol.*, 17 : 5 – 16.
- [474] Riley, K.P., Snowdon, D.A., Desrosiers, M.F., Markesbery, W.R. 2005. Early life linguistic ability, late life cognitive function, and neuropathology: Findings from the Nun Study. *Neurobiol. Aging*, 26: 341 – 347.

- [475] Rinne, J. O., Brooks, D.J., Rossor, M.N., Fox, N.C., Bullock, R., Klunk, W.E., Mathis, C.A., Blennow, K., Barakos, J., Okello, A.A., Rodriguez Martinez de Liano, S., Liu, E., Koller, M., Gregg, K.M., Schenk, D., Black, R., Grundman, M. 2010. 11C-PiB PET assessment of change in fibrillar amyloid- $\beta$  load in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a phase 2, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study. *Lancet Neurol.*, 9 : 363 – 372.
- [476] Risner, M.E., Saunders, A.M., Altman, J.F., Ormandy, G.C., Craft, S., Foley, I.M., Zvartau-Hind, M.E., Hosford, D.A., Roses, A.D. 2006. Rosiglitazone in Alzheimer's Disease Study Group. Efficacy of rosiglitazone in a genetically defined population with mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Pharmacogenomics J.*, 6 (4) : 246 - 254.
- [477] Risold, P.Y., Swanson, L.W. 1997. Connections of the rat lateral septal complex. *Brain. Res. Rev.*, 24 : 115–195.
- [478] Rivera-Arconada, I., Martínez-Gómez, J., A. López-García, A. 2004. M-current modulators alter rat spinal nociceptive transmission: an electrophysiological study in vitro. *Neuropharmacology*, 46: 598 – 606.
- [479] Rivera, A. I. 2006. Papel de los canales de potasio tipo M en la transmisión nociceptiva a través de la médula espinal. [Tesis Doctoral] Alcalá, España.
- [480] Roberson, E.D., Mucke, L. 2006. 100 years and counting: prospects for defeating Alzheimer's disease. *Science*, 314 : 781 – 784.
- [481] Roberson E.D., Searce-Levie, K., Palop, J.J., Yan, F., Cheng, I.H., Wu, T., Gerstein, H., Yu, G.Q., Mucke, L. 2007. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science*, 316: 750 – 754.
- [482] Robbins, J. 2001. KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Ther.*, 90: 1-19.
- [483] Robbins, J., Marsh, S.J., Brown, D.A. 2006. Probing the regulation of M (Kv7) potassium channels in intact neurons with membrane-targeted peptides. *J. Neurosci.*, 26: 7950–7961.
- [484] Robichaud, A.J. 2006. Approaches to palliative therapies for Alzheimer's disease. *Curr. Top. Med. Chem.*, 6: 553 – 568.
- [485] Robinson, D.M., Keating, G.M. 2006. Memantine: a review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs*, 66 : 1515 – 1534.
- [486] Roche, J.P., Westenbroek, R., Sorom, A.J., Hille, B., Mackie, K., Shapiro, M.S. 2002. Antibodies and a cysteine-modifying reagent show correspondence of M current in neurons to KCNQ2 and KCNQ3 K<sup>+</sup> channels. *Br. J. Pharmacol.*, 137 : 1173 – 1186.
- [487] Rockwood, K., Beattie, B.L., Eastwood, M.R., Feldman, H., Mohr, E., Pryse-Phillips, W., Gauthier, S. 1997. A randomized, controlled trial of linopirdine in the treatment of Alzheimer's disease. *Can. J. Neurol. Sci.*, 24 : 140 – 145.

- [488] Rogawski, M.A. 2008. New Molecular Targets for Antiepileptic Drugs:  $\alpha 2\delta$ , SV2A and Kv7/KCNQ/M Potassium Channels. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, 8 : 345–352.
- [489] Romero, M., Reboreda, A., Sánchez, E., Lamas, J.A. 2004. Newly developed blockers of the M-current do not reduce spike frequency adaptation in cultured mouse sympathetic neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 19 : 2693 -2702.
- [490] Ropper, A., Brown, R. H. 2005. Degenerative diseases of the nervous system. En: Adams, R., Victor, M. eds. *Adams & Victor's Principles of Neurology*. 8va edición. U.S. A. p 895 – 930.
- [491] Rowe, W.B., O'Donnell, J.P., Pearson, D., Rose, G.M., Meaney, M.J., Quirion, R. 2003. Long-term effects of BIBN-99, a selective muscarinic M2 receptor antagonist, on improving spatial memory performance in aged cognitively impaired rats. *Behav. Brain Res.*, 145 (1-2): 171 - 178.
- [492] Roy, M.L., Narahashi, T. 1992. Differential properties of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.*, 12 (6) : 2104 - 2111.
- [493] Roychaudhuri, R., Yang, M., Hoshi, M.M., Teplow, D.B. 2009. Amyloid  $\beta$ -protein assembly and Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.*, 284 (8): 4749 – 4753.
- [494] Rushworth, J. V., Hooper, N. M. 2011. Lipid Rafts: Linking Alzheimer's Amyloid- $\beta$  Production, Aggregation, and Toxicity at Neuronal Membranes (Review). *Int. J. Alzheimers Dis.*, 2011: art 603052.
- [495] Rusten, T.E., Simonsen, A. 2008. ESCRT functions in autophagy and associated disease. *Cell Cycle*, 7 (9) : 1166 - 1172.
- [496] Ryoo, S. R., Jeong, H. K., Radnaabazar, C., Yoo, J. J., Cho, H. J., Lee, H. W., Kim, I. S., Cheon, Y. H., Ahn, Y. S., Chung, S. H., Song, W. J. 2007. DYRK1A-mediated hyperphosphorylation of Tau. A functional link between Down syndrome and Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.*, 282, 34850 - 34857.
- [497] Sabbagh, M. N., Shah, F., Reid, R. T., Sue, L., Connor D. J., Peterson, N., Beach, T. G. 2006. Pathological and Nicotinic Receptor Binding Differences Between Mild Cognitive Impairment, Alzheimer Disease, and Normal Ageing. *Arch. Neurol.*, 63: 1771 – 1776.
- [498] Sabbagh, M.N. 2009. Drug Development for Alzheimer's Disease: Where Are We Now and Where Are We Headed? *Am. J. Geriatr. Pharmacother.*, 7 (3) : 167 – 185.
- [499] Sabbagh, M.N., Thind, K., Sparks, L.D. 2009. On cholesterol levels and statins in cognitive decline and Alzheimer's disease; progress and setbacks. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, 23 (4) : 303 – 305.

- [500] Sadock, J.B., Sadock, V.A. 2008. Delirium, dementia, amnestic and other cognitive disorders and mental disorders due to a medical condition En: Lippincott Williams Wilkins. eds Kaplan and Sadock's Concise Textbook of Clinical Psychiatry. 3era edición. Filadelfia. p 46 – 80.
- [501] Safiulina, V.F., Zacchi, P., Tagliatela, M., Yaari, Y., Cherubini, E. 2008. Low expression of Kv7/M channels facilitates intrinsic and network bursting in the developing rat hippocampus. *J. Physiol.*, 586 (Pt 22) : 5437 - 5453.
- [502] Saito, T., Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Takano, J., Huang, S.M., Suemoto, T., Higuchi, M., Saido, T.C. 2005. Somatostatin regulates brain amyloid beta peptide Abeta42 through modulation of proteolytic degradation. *Nat. Med.*, 11 (4) : 434 - 439.
- [503] Sakurai, T. 2011. Targets of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor {gamma} Agonist Trials for the Prevention of Alzheimer Disease. *Arch. Neurol.*, 68 (4) : 542.
- [504] Salloway, S., Sperling, R., Gilman, S., Fox, N.C., Blennow, K., Raskind, M., Sabbagh, M., Honig, L.S., Doody, R., van Dyck, C.H., Mulnard, R., Barakos, J., Gregg, K.M., Liu, E., Lieberburg, I., Schenk, D., Black, R., Grundman, M. 2009. A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer's disease. *Neurology*, 73: 2061 – 2070.
- [505] Salter, M.W., Kalia, L.V. 2004. Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nat. Rev. Neurosci.*, 5 (4) : 317 - 328.
- [506] Sambamurti, K., Rao, J., Pappolla, M.A. 2009. Frontiers in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Indian J. Psychiatry*, 51 (5): 56 -60.
- [507] Sando, S.B., Melquist, S., Cannon, A., Hutton, M. L., Sletvold, O., Saltvedt, I., White, L.R., Lydersen, S., Aasly, J.O. 2008. APOE  $\epsilon$ 4 lowers age at onset and is a high risk factor for Alzheimer's disease; A case control study from central Norway. *BMC Neurol.*, 8 (9): 1 -7.
- [508] Sankaranarayanan, S., Holahan, M.A., Colussi, D., Crouthamel, MC., Devanarayan, V., Ellis, J., Espeseth, A., Gates, A.T., Graham, S.L., Gregro, A.R., Hazuda, D., Hochman, J.H., Holloway, K., Jin, L., Kahana, J., Lai, MT., Lineberger, J., McGaughey, G., Moore, K.P., Nantermet, P., Pietrak, B., Price, E.A., Rajapakse, H., Stauffer, S., Steinbeiser, M.A., Seabrook, G., Selnick, H.G., Shi, XP., Stanton, M.G., Swestock, J., Tugusheva, K., Tyler, K.X., Vacca, J.P., Wong, J., Guoxin Wu, G., Min Xu, M. Jacquelynn J. Cook, J.J., Adam J. Simon, A.J. 2009. First Demonstration of Cerebrospinal Fluid and Plasma ALowering with Oral Administration of a  $\beta$ -Site Amyloid Precursor Protein-Cleaving Enzyme 1 Inhibitor in Nonhuman Primates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 328 : 131 – 140.
- [509] Santos-Torres, J., Fuente, A., Criado, J. M., Sanchez, R. A., Heredia, M., Yajeya, J. 2007 Glutamatergic Synaptic Depression by Synthetic Amyloid  $\beta$  - peptide in the Medial Septum. *J. Neurosci. Res.*, 85 : 634 – 648.
- [510] Sastre, M., Gentleman, S.M. 2010 NSAIDs: how they work and their prospects as therapeutics in Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.*, 2 : 20.

- [511] Savonenko, A.V., Melnikova, T., Laird, F.M., Stewart, K.A., Price, D.L., Wong, P.C. 2008. Alteration of BACE1-dependent NRG1/ErbB4 signaling and schizophrenia-like phenotypes in BACE1-null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105 : 5585 - 5590.
- [512] Schaeffer, E.L., Gattaz, W.F. 2008. Cholinergic and glutamatergic alterations beginning at the early stages of Alzheimer disease: participation of the phospholipase A2 enzyme. *Psychopharmacology*, 198 : 1 – 27.
- [513] Schaffer, B.A., Bertram, L., Miller, B.L., Mullin, K., Weintraub, S., Johnson, N., Bigio, E.H., Mesulam, M., Wiedau-Pazos, M., Jackson, G.R., Cummings, J.L., Cantor, R.M., Levey, A.I., Tanzi, R.E., Geschwind, D.H. 2008. Association of GSK3B with Alzheimer disease and frontotemporal dementia. *Arch. Neurol.*, 65 (10) : 1368 - 1374.
- [514] Scheltens, P., Kamphuis, P.J., Verhey, F.R., Olde-Rikkert, M.G., Wurtman, R.J., Wilkinson, D., Twisk, J.W., Kurz, A. 2010. Efficacy of a medical food in mild Alzheimer's disease: A randomized, controlled trial. *Alzheimers Dement.*, (1) :1 - 10.e1.
- [515] Schliebs R, Arendta, T. 2006. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.*, 113 (11) :1625 -1644.
- [516] Schliebs, R., Arendta, T. 2010. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav. Brain Res.*, Article in Press.
- [517] Schnee, M. E., Brown, B. S. 1998. Selectivity of Linopirdine (DuP 996), a Neurotransmitter Release Enhancer, in Blocking Voltage-Dependent and Calcium-Activated Potassium Currents in Hippocampal Neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 286 (2): 709 - 717.
- [518] Schneeberger, A., Mandler, M., Otawa, O., Zauner, W., Mattner, F., Schmidt, W. 2009. Development of AFFITOPE vaccines for Alzheimer's disease (AD)-from concept to clinical testing. *J. Nutr. Health Aging*, 13 (3) : 264 - 267.
- [519] Schneider, A., Mandelkow, E. 2008. Tau-based treatment strategies in neurodegenerative diseases. *Neurotherapeutics*, 5: 443 – 457.
- [520] Schneider, L.S., Dagerman, K.S., Higgins, J.P., McShane, R. 2011. Lack of Evidence for the Efficacy of Memantine in Mild Alzheimer Disease. *Arch. Neurol.*, 68 (8) : 991 - 998.
- [521] Schroeder, B.C., Hechenberger, M., Weinreich, F., Kubisch, C., Jentsch, T.J., 2000. KCNQ5, a novel potassium channel broadly expressed in brain, mediates M - type currents. *J. Biol. Chem.*, 275 : 24089 - 24095.
- [522] Schulman, H. 2004. Intracellular Signaling. En: Byrne, J. H., Roberts, J. L. A. eds. From Molecules to Networks. An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience. California. p 335 – 370.
- [523] Schulman, H., Roberts, J. L. 2008. Intracellular Signaling. En: Squire y cols. eds. Fundamental Neuroscience. California. p 205 – 226.

- [524] Schwake, M., Jentsch, T.J., Friedrich, T. 2003. A carboxy-terminal domain determines the subunit specificity of KCNQ K<sup>+</sup> channel assembly. *EMBO Rep.*, 4: 76 - 81.
- [525] Schwake, M., Athanasiadu, D., Beimgraben, C., Blanz, J., Beck, C., Jentsch, T.J., Saftig, P., Friedrich, T. 2006. Structural determinants of M-type KCNQ (Kv7) K<sup>+</sup> channel assembly. *J. Neurosci.*, 26 : 3757 – 3766.
- [526] Schweitzer, P., 2000. Cannabinoids decrease the K(+) M-current in hippocampal CA1 neurons. *J. Neurosci.*, 20 : 51-58.
- [527] Seabrook, G.R., Ray, W.J., Shearman, M., Hutton, M. 2007. Beyond amyloid: the next generation of Alzheimer's disease therapeutics. *Mol. Interv.*, 7 (5) : 261 - 270.
- [528] Selkoe, D.J. 2008. Biochemistry and molecular biology of amyloid beta-protein and the mechanism of Alzheimer's disease. En: Duyckaerts, C., Litvan, I. eds Dementias: Handbook of Clinical Neurology. Amsterdam. p 245 – 260.
- [529] Selyanko, A. A., Hadley, J.K., Wood, I.C., Abogadie, F.C., Delmas, P., Buckley, N.J., London, B., Brown, D.A. 1999. Two types of K<sup>+</sup> channel subunit, Erg1 and KCNQ2/3, contribute to the M-like current in a mammalian neuronal cell. *J. Neurosci.*, 19 (18) : 7742 – 7756.
- [530] Selyanko, A.A., Hadley, J.K., Wood, I.C., Abogadie, F.C., Jentsch, T.J., Brown, D.A. 2000. Inhibition of KCNQ1-4 potassium channels expressed in mammalian cells via M1 muscarinic acetylcholine receptors. *J. Physiol.*, 522: 349 – 355.
- [531] Selyanko, A. A., Hadley, J. K., Brown, D. A. 2001. Properties of single M-type KCNQ2/KCNQ3 potassium channels expressed in mammalian cells. *J. Physiol. (Lond.)*, 534:15–24.
- [532] Sennvik, K., Fastbom, J., Blomberg, M., Wahlund, L.O., Winblad, B., Benedikz, E. 2000. Levels of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci. Lett.*, 278 (3) : 169 - 172.
- [533] Seo, S.J., Hwang, D.Y., Cho, J.S., Chae, K.R., Kim, C.K., Shim, S.B., Jee, S.W., Lee, S.H., Sin, J.S., Choi, S.Y., Kim, J., Kim, Y.K. 2007. PEN-2 overexpression induces  $\gamma$ -secretase protein and its activity with amyloid  $\beta$ -42 production. *Neurochem. Res.*, 32 (6) : 1016-1023.
- [534] Sepulveda, F.J., Parodi, J., Peoples, R.W., Opazo, C., Aguayo, L.G. 2010. Synaptotoxicity of Alzheimer Beta Amyloid Can Be Explained by Its Membrane Perforating Property. *PLoS ONE*, 5 (7): e 11820.
- [535] Serneels, L., Van Biervliet, J., Craessaerts, K., Dejaegere, T., Horr , K., Van Houtvin, T., Esselmann, H., Paul, S., Schäfer, M.K., Berezovska, O., Hyman, B.T., Sprangers, B., Sciot, R., Moons, L., Jucker, M., Yang, Z., May, P.C., Karran, E., Wiltfang, J., D'Hooge, R., De Strooper, B. 2009.  $\gamma$ -Secretase heterogeneity in the Aph1 subunit: relevance for Alzheimer's disease. *Science*, 324 (5927) : 639 - 642.

- [536] Sevilla, N.T. 2008. Mecanismos de Modulación de la Transducción de Señales dependientes del Receptor de Productos Avanzados de Glicación. [Tesis Doctoral] Granada, España.
- [537] Shah, M.M., Migliore, M., Valencia, I., Cooper, E.C., Brown, D. A. 2008. Functional significance of axonal Kv7 channels in hippocampal pyramidal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105 : 7869 – 7874.
- [538] Shankar, G.M., Bloodgood, B.L., Townsend, M., Walsh, D.M., Selkoe, D.J., Sabatini, B.L. 2007. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J. Neurosci.*, 27: 2866 – 2875.
- [539] Shapiro, M.S., Roche, J.P., Kaftan, E.J., Cruzblanca, H., Mackie, K., Hille, B. 2000. Reconstitution of muscarinic modulation of the KCNQ2/KCNQ3 K<sup>+</sup> channels that underlie the neuronal M current. *J. Neurosci.*, 20: 1710 – 1721.
- [540] Shen, J.B., Jiang, B. y Pappano, A.J. 1999. Lack of effect of McN-A-343 on membrane current and contraction in guinea pig ventricular myocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 290: 641-648.
- [541] Shieh, C.C., Coghlan, M., Sullivan, J.P., Gopalakrishnan, M. 2000. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol. Rev.*, 52 (4) : 557 - 594.
- [542] Shimohama, S. 2009. Nicotinic receptor-mediated neuroprotection in neurodegenerative disease models. *Biol. Pharm. Bull.*, 32 (3) : 332 -336.
- [543] Siegel, G.S., Chauhan, N., Karczmar, A. G. 2007. Links between Amyloid and Tau Biology in Alzheimer's Disease and Their Cholinergic Aspects. En: Karczmar, A.G ed. *Exploring the Vertebrate Central Cholinergic Nervous System*. New York. p. 597 - 603.
- [544] Silvestri, R. 2009. Boom in the development of non-peptidic beta-secretase (BACE1) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Med. Res. Rev.*, 29 (2) : 295 - 338.
- [545] Simonsen, A.H., McGuire, J., Hansson, O., Zetterberg, H., Podust, V.N., Davies, H.A., Waldemar, G., Minthon, L., Blennow, K. 2007. Novel panel of cerebrospinal fluid biomarkers for the prediction of progression to Alzheimer dementia in patients with mild cognitive impairment. *Arch. Neurol.*, 64: 366 – 370.
- [546] Sipilä, S.T., Huttu, K., Voipio, J., Kaila, K. 2006. Intrinsic bursting of immature CA3 pyramidal neurons and consequent giant depolarizing potentials are driven by a persistent Na<sup>+</sup> current and terminated by a slow Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current. *Eur. J. Neurosci.*, 23 (9) : 2330 - 2338.
- [547] Slack, B.E., Ma, L.K., Seah, C.C. 2001. Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor-alpha converting enzyme. *Biochem. J.*, 357 : 787 - 794.

- [548] Slack, B.E., Wurtman, R.J. 2007. Regulation of synthesis and metabolism of the amyloid precursor protein by extracellular signals. En: Sun, M.K. ed. *Research Progress in Alzheimer's Disease and Dementia Vol 2*. Nueva York. p 1 – 25.
- [549] Small, D.H. 2009. Dysregulation of calcium homeostasis in Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.*, 34 (10) : 1824 - 1829.
- [550] Small, S. A., Mayeux, R. 2005. Alzheimer Disease and Related Dementias. En: Rowland, L.P. eds. *Merritt's Neurology*. Baltimore. p 633 - 643.
- [551] Smith, C. M. 2003. G-Protein-Coupled Receptors. En: *Elements of Molecular Neurobiology*, John Wiley & Sons Ltd, eds. Chichester. p 167 – 196.
- [552] Snyder, E.M., Nong, Y., Almeida, C.G., Paul, S., Moran, T., Choi, E.Y., Nairn, A.C., Salter, M.W., Lombroso, P.J., Gouras, G.K., Greengard, P. 2005. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat. Neurosci.*, 8 (8): 1051-1058.
- [553] Soares, H., Raha, N., Sikpi, M., Liston, D., Brodney, M., Coffman, K., Tate, B., Qiu, R., Wang, E.Q., Li, X., Hidi, R., Banerjee, S., Jhee, S., Ereshefsky, L., Fullerton, T. 2009. A $\beta$  variability and effect of gamma secretase inhibition on cerebrospinal fluid levels of A $\beta$  in healthy volunteers. *Alzheimer Dement.*, 5 (4 Suppl 1) : S252 – S253.
- [554] Söderman, A., Thomsen, M.S., Hansen, H.H., Nielsen, E.Ø., Jensen, M.S., West, M.J., Mikkelsen, J.D. 2008. The nicotinic  $\alpha 7$  acetylcholine receptor agonist ssr180711 is unable to activate limbic neurons in mice overexpressing human amyloid-beta1-42. *Brain Res.*, 1227: 240 - 247.
- [555] Sonkusare, S.K., Kaul, C.L., Ramarao, P. 2005. Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders - memantine, a new hope. *Pharmacol. Res.*, 51 (1) :1 - 17.
- [556] Sontag, E., Nunbhakdi-Craig, V., Sontag, J.M., Diaz-Arrastia, R., Ogris, E., Dayal, S., Lentz, S.R., Arning, E., Bottiglieri, T. 2007. Protein phosphatase 2A methyltransferase links homocysteine metabolism with tau and amyloid precursor protein regulation. *J. Neurosci.*, 27: 2751 – 2759.
- [557] Song, M.K., Cui, Y.Y., Zhang, W.W., Zhu, L., Lu, Y., Chen, H.Z. 2009. The facilitating effect of systemic administration of Kv7/M channel blocker XE991 on LTP induction in the hippocampal CA1 area independent of muscarinic activation. *Neurosci. Lett.*, 461 (1) : 25 - 29.
- [558] Soriani, O., Le Foll, F., Galas, L., Roman, F., Vaudry, H., Cazin, L., 1999. The sigma ligand (+)-pentazocine depresses M current and enhances calcium conductances in frog melanotrophs. *Am. J. Physiol.*, 277: E73 - E80.
- [559] Spalding, T.A., Burstein, E.S. 2006. Constitutive activity of muscarinic acetylcholine receptors. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.*, 26 : 61 – 85.



- [560] Sparks, D.L., Kryscio, R.J., Connor, D.J., Sabbagh, M.N., Sparks, L.M., Lin, Y., Liebsack, C. 2010. Cholesterol and cognitive performance in normal controls and the influence of elective statin use after conversion to mild cognitive impairment: results in a clinical trial cohort. *Neurodegener. Dis.*, 7 (1-3) : 183 - 186.
- [561] Spruston, N., Johnston, D. 1992. Perforated patch-clamp analysis of the passive membrane properties of three classes of hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.*, 67 : 508 -529.
- [562] Spruston, N., McBain, C. 2007. Structural and Functional Properties of Hippocampal Neurons. En: Andersen, P. y cols. eds. *The Hippocampus Book*. Manhattan, N.Y. p 133 - 201.
- [563] Standridge, J.B. 2004. Pharmacotherapeutic approaches to the treatment of Alzheimer's disease. *Clin. Ther.*, 26 (5) : 615 - 630.
- [564] Steensland, P., Simms, J.A., Holgate, J., Richards, J.K., Bartlett, S.E. 2007. Varenicline, an  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, selectively decreases ethanol consumption and seeking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104 : 12518 – 12523.
- [565] Stoothoff, W.H., Johnson, G.V. 2005. Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim. Biophys. Acta*. 1739 (2-3) : 280 - 297.
- [566] Storm, J.F. 1987. Action potential repolarization and a fast afterhyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol.*, 385 : 733 – 759.
- [567] Storm, J.F. 1990 Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. *Prog. Brain Res.*, 83 : 161 – 187.
- [568] Stutzmann, G.E., Caccamo, A., LaFerla, F., Parker, I. 2004. Dysregulated IP3 signaling in cortical neurons of knock-in mice expressing an Alzheimer's-linked mutation in presenilin1 results in exaggerated  $\text{Ca}^{2+}$  signals and altered membrane excitability. *J. Neurosci.*, 24: 508 – 513.
- [569] Su, H., Alroy, G., Kirson, E.D., Yaari, Y. 2001. Extracellular calcium modulates persistent sodium current-dependent burst-firing in hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.*, 21: 4173 - 4182.
- [570] Suh, B.C., Hille, B. 2002. Recovery from muscarinic modulation of M-current channels requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis. *Neuron*, 35: 507 – 520.
- [571] Suh, B.C., Horowitz, L.F., Hirdes, W., Mackie, K., Hille, B. 2004. Regulation of KCNQ2/KCNQ3 current by G protein cycling: the kinetics of receptor-mediated signaling by Gq. *J. Gen. Physiol.*, 123 (6) : 663 - 683.
- [572] Surti, T.S., Huang, L., Jan, Y.N., Jan, L.Y., Cooper, E.C., 2005. Identification by mass spectrometry and functional characterization of two phosphorylation sites of KCNQ2/KCNQ3 channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102: 17828 - 17833.

- [573] Swanson, L.W. 2000. Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain Res.*, 886: 113 –164
- [574] Sweatt, J.D. 2010. Aging-Related Memory Disorders - Alzheimer 's Disease. En: Academic Press eds. Mechanisms of Memory. San Diego, C.A. p 293 - 319.
- [575] Szado, T., Vanderheyden, V., Parys, J.B., De Smedt, H., Rietdorf, K., Kotelevets, L., Chastre, E., Khan, F., Landegren, U., Söderberg, O., Bootman, M.D., Roderick, H.L. 2008. Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by protein kinase B/Akt inhibits  $\text{Ca}^{2+}$  release and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105 : 2427 – 2432.
- [576] Taly, A., Corringer, P.J., Guedin, D., Lestage, P., Changeux, J. P. 2009. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 8 : 733 - 750.
- [577] Tansey, E.M. 2006. Henry Dale and the discovery of acetylcholine. *C. R. Biol.*, 329 (5-6) : 419 -425.
- [578] Tanzi, R.E., Bertram, L. 2005. Twenty Years of the Alzheimer's Disease Amyloid Hypothesis: A Genetic Perspective (Review). *Cell*, 120 : 545 – 555.
- [579] Tanzi, R.E. 2006. From the amyloid  $\beta$  protein (A4) to isolation of the first Alzheimer's disease gene: amyloid  $\beta$  (A4) precursor protein (APP) En: Jucker, M. y cols eds. Alzheimer: 100 Years and Beyond. Berlin. p 163 – 169.
- [580] Teipel, S.J., Pruessner, J.C., Faltraco, F., Born, C., Rocha-Unold, M., Evans, A., Moller, H.J., Hampel, H. 2006. Comprehensive dissection of the medial temporal lobe in AD: measurement of hippocampus, amygdala, entorhinal, perirhinal and parahippocampal cortices using MRI. *J. Neurol.*, 253 : 794 – 800.
- [581] Teng, L., Zhao, J., Wang, F., Ma, L., Pei, G. 2010. A GPCR/secretase complex regulates beta- and gamma-secretase specificity for Abeta production and contributes to AD pathogenesis. *Cell. Res.*, 20 (2) : 138 - 153.
- [582] Thathiah, A., Spittaels, K., Hoffmann, M., Staes, M., Cohen, A., Horre, K., Vanbrabant, M., Coun, F., Baekelandt, V., Delacourte, A., Fischer, D.F., Pollet, D., De Strooper, B., Merchiers, P. 2009. The orphan G protein-coupled receptor 3 modulates amyloid  $\beta$  peptide generation in neurons. *Science*, 323 : 946 – 951.
- [583] Thathiah, A., De Strooper, B. 2011. The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, 12 (2) : 73 - 87.
- [584] Thinschmidt, J.S., Ren, K., King, M.A., Meyer, E.M., Papke, R.L. 2008. Modulation of spontaneous hippocampal synaptic events with 5-hydroxyindole, 4OH GTS-21, and rAAV mediated  $\alpha 7$  nicotinic receptor gene transfer. *Brain Res.*, 1203: 51 – 60.

- [585] Thomas, R.L., Mistry, R., Langmead, C.J., Wood, M.D., Challiss, R.A. 2008. G protein coupling and signaling pathway activation by m1 muscarinic acetylcholine receptor orthosteric and allosteric agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 327 (2) : 365 - 374.
- [586] Togashi, K., Inada, H., Tominaga, M. 2008. Inhibition of the transient receptor potential cation channel TRPM2 by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *Brit. J. Pharmacol.*, 153 : 1324–1330.
- [587] Tombola, F., Pathak, M.M., Isacoff, E.Y. 2006. How does voltage open an ion channel? *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 22 : 23 - 52.
- [588] Tomita, T. 2009. Secretase inhibitors and modulator for Alzheimer's disease treatment. *Expert Rev. Neurother.*, 9 (5) : 661 - 679.
- [589] Town, T. 2010. Alzheimer's disease beyond A $\beta$ : Symposium Report. *Expert. Rev. Neurother.*, 10 (5) : 671 – 675.
- [590] Tzavara, E.T., Bymaster, F.P., Davis, R.J., Wade, M.R., Perry, K.W., Wess, J., McKinzie, D.L., Felder, C., Nomikos, G.G. 2004. M4 muscarinic receptors regulate the dynamics of cholinergic and dopaminergic neurotransmission: relevance to the pathophysiology and treatment of related CNS pathologies. *FASEB J.*, 18 (12) : 1410 - 1412.
- [591] Uemura, K., Lill, C.M., Li, X., Peters, J.A., Ivanov, A., Fan, Z., DeStrooper, B., Bacskai, B.J., Hyman, B.T., Berezovska, O. 2009. Allosteric Modulation of PS1/ $\gamma$ -Secretase Conformation Correlates with Amyloid  $\beta$ 42/40 Ratio. *PLoS ONE*, 4 (11) : e7893.
- [592] Upadhyaya, P., Seth, V., Ahmad, M., 2010. Therapy of Alzheimer's disease: An update. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, 4 (6): 408 – 421.
- [593] Upton, N., Chuang, T.T., Hunter, A.J., Virley, D.J. 2008. 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonists as novel cognitive enhancing agents for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, 5 (3) : 458 - 469.
- [594] Valdivieso, F., Bullido, M. J. 2002. Disección Genética de la Enfermedad de Alzheimer. En: García, G. A., Gandía, L. eds Fronteras en la Enfermedad de Alzheimer. Madrid. p 79 – 100.
- [595] Valera, E. M. 2006. Estudio de la neuroprotección por trímeros de N-alquilglicina frente a excitotoxicidad y neurodegeneración mediada por la proteína amiloidea: mecanismos de acción [Tesis Doctoral] Badajoz, España.
- [596] Van Hoesen, G.W., Augustinack, J.C., Dierking, J., Redman, S.J., Thangavel, R. 2000. The parahippocampal gyrus in Alzheimer's disease. Clinical and preclinical neuroanatomical correlates. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 911 : 254 – 274.
- [597] Van Rijn, C.M. Willems-Van Bree, E. 2003. Synergy between retigabine and GABA in modulating the convulsant site of the GABA<sub>A</sub> receptor complex. *Eur. J. Pharmacol.*, 464 : 95 – 100.

- [598] Vegeto, E., Benedusi, V., Maggi, A. 2008. Estrogen anti-inflammatory activity in brain: a therapeutic opportunity for menopause and neurodegenerative diseases. *Front. Neuroendocrinol.*, 29 (4) : 507 – 519.
- [599] Velázquez-Flores, M., Salceda, R. 2011. Modulación de los receptores ionotrópicos de tipo cys-loop por proteincinasas A y C. *Rev. Neurol.*, 52 (3): 173-181.
- [600] Velliquette, R.A., O'Connor, T., Vassar, R. 2005. Energy inhibition elevates beta-secretase levels and activity and is potentially amyloidogenic in APP transgenic mice: Possible early events in Alzheimer's disease pathogenesis. *J. Neurosci.*, 25: 10874 – 10883.
- [601] Verdile, G., Fuller, S., Atwood, C.S., Laws, S.M., Gandy, S.E., Martins, R.N. 2004. The role of beta amyloid in Alzheimer's disease: still a cause of everything or the only one who got caught? *Pharmacol. Res.*, 50 (4) : 397 - 409.
- [602] Vervaeke, K., Gu, N., Agdestein, C., Hu, H., Storm, J.F. 2006. Kv7/KCNQ/M-channels in rat glutamatergic hippocampal axons and their role in regulation of excitability and transmitter release. *J. Physiol.*, 576 (Pt 1) : 235 - 256.
- [603] Vickroy, T.M. 1993. Presynaptic cholinergic actions by the putative cognitive enhancing DuP 966. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 246 : 910 - 917.
- [604] Volpicelli, L.A., Levey, A.I. 2004. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in cerebral cortex and hippocampus. *Prog. Brain Res.*, 145 : 59 – 66.
- [605] Walhovd, K.B., Fjell, A.M., Brewer, J., McEvoy, L.K., Fennema-Notestine, C., Hagler, D.J., Jennings, R.G., Karow, D., Dale, A.M. 2010. Combining MR Imaging, Positron-Emission Tomography, and CSF Biomarkers in the Diagnosis and Prognosis of Alzheimer Disease. *Am. J. Neuroradiol.*, 31 : 347 – 354.
- [606] Walsh, D.M., Selkoe, D.J. 2004. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron*, 44: 181 – 193.
- [607] Walsh, D.M., Selkoe, D.J. 2007. A $\beta$  oligomers - a decade of discovery. *J. Neurochem.*, 101: 1172 – 1184.
- [608] Walton, H.S., Dodd, P.R. 2007. Glutamate-glutamine cycling in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.*, 50 (7-8) : 1052 - 1066.
- [609] Wang, H.S., Pan, Z., Shi, W., Brown, B.S., Wymore, R.S., Cohen, I.S., Dixon, J.E., McKinnon, D. 1998. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science*, 282 :1890 –1893.
- [610] Wang, H.S., Brown, B.S., McKinnon, D., Cohen, I.S. 2000. Molecular basis for differential sensitivity of KCNQ and I<sub>(Ks)</sub> channels to the cognitive enhancer XE991. *Mol. Pharmacol.*, 57 (6): 1218 - 1223.

- [611] Wang, K., Hackett, J.T., Cox, M.E., Van Hoek, M., Lindstrom, J.M., Parsons, S.J. 2004. Regulation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor by SRC family tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.*, 279: 8779 – 8786.
- [612] Wang, D.S., Dickson, D.W., Malter, J.S. 2006.  $\beta$  - Amyloid degradation and Alzheimer's disease. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2006 (3) : 58406.
- [613] Wang, X.P., Ding, H.L. 2008. Alzheimer's disease: epidemiology, genetics, and beyond. *Neurosci. Bull.*, 24 (2) : 105-109.
- [614] Wang, J.M., Sun, C. 2010. Calcium and neurogenesis in Alzheimer's disease. *Front. Neurosci.*, 194 (4) : 1 - 5.
- [615] Ward, M.W., Concannon, C.G., Whyte, J., Walsh, C.M., Corley, B., Prehn, J.H. 2010. The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) disrupts actin dynamics and mitochondrial bioenergetics. *J. Neurochem.*, 113 (1) :275 -284.
- [616] Watanabe, S., Hong, M., Lasser-Ross, N., Ross, W.N. 2006. Modulation of calcium wave propagation in the dendrites and to the soma of rat hippocampal pyramidal neurons. *J. Physiol.*, 575: 455 – 468.
- [617] Watanabe, T., Yamagata, N., Takasaki, K., Sano, K., Hayakawa, K., Katsurabayashi, S., Egashira, N., Mishima, K., Iwasaki, K., Fujiwara, M., 2009. Decreased acetylcholine release is correlated to memory impairment in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res.*, 1249: 222 – 228.
- [618] Watkins, J.C., Pook, P.C., Sunter, D.C., Davies, J., Honore, T. 1990. Experiments with kainate and quisqualate agonists and antagonists in relation to the sub-classification of 'non-NMDA' receptors. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 268 : 49 - 55.
- [619] Waxham, N. M. 2004. Neurotransmitter Receptors. En: Byrne, J. H., Roberts, J. L. A. eds. From Molecules to Networks. An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience. California. p 299 – 334.
- [620] Waxman, S.G. 2009. The Limbic System. En: Mc Graw Hill. Lange Medical Books. eds. Clinical Neuroanatomy. Nueva York. p 229 – 239.
- [621] Weiner, H.L. Frenkel, D. 2006. Immunology and immunotherapy in Alzheimer's disease. *Nature Rev. Immunol.*, 6: 404 - 416.
- [622] Wen, H., Levitan, I. B. 2002. Calmodulin is an auxiliary subunit of KCNQ2/3 potassium channels. *J. Neurosci.* 22: 7991–8001.
- [623] Wen, Y., Onyewuchi, O., Yang, S., Liu, R., Simpkins, J.W. 2004. Increased  $\beta$ -secretase activity and expression in rats following transient cerebral ischemia. *Brain Res.*, 1009 : 1 – 8.
- [624] Wenk, G.L. 2006. Neuropathologic changes in Alzheimer's disease: potential targets for treatment. *J. Clin. Psychiatry*, 67 (Suppl 3): 3 - 7.

- [625] Wess, J. 2004. Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 44 : 423 - 450.
- [626] Wess, J., Eglen, R.M., Gautam, D. 2007. Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 6 (9) : 721 - 733.
- [627] Willem, M., Garratt, A.N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., DeStrooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C., Haass, C. 2006. Control of Peripheral Nerve Myelination by the  $\beta$ -Secretase BACE1. *Science*, 314 (5799) : 664 –666.
- [628] Wilson, D., Peters, R., Ritchie, K., Ritchie, C.W. 2011. Latest advances on interventions that may prevent, delay or ameliorate dementia Therapeutic Advances in Chronic Disease. *Ther. Adv. Chronic Dis.*, 2 (3) : 161 - 173.
- [629] Wimo, A., Prince, M. 2010. World Alzheimer Report 2010: the global economic impact of dementia. London: Alzheimer's Disease International (ADI), September 2010.
- [630] Winblad, B.G., Minthon, L., Floesser, A., Imbert, G., Dumortier, T., He, Y., Maguire, P., Karlsson, M., Östlund, H., Lundmark, J., Orgogozo, J.M., Graf, A., Andreasen, N. 2009. Results of the first-in-man study with the active Abeta immunotherapy CAD106 in Alzheimer patients. *Alzheimer Dement.*, 5 (4 Suppl 1): S113-S114.
- [631] Winks, J. S., Hughes, S., Filippov, A.K., Tatulian, L., Abogadie, F.C., Brown, D. A., Marsh, S. J. 2005. Relationship between membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and receptor mediated inhibition of native neuronal M channels. *J. Neurosci.*, 25: 3400 – 3413.
- [632] Witter, M.P., Groenewegen, H.J., Lopes da Silva, F.H., Lohman, A.H. 1989. Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Progr. Neurobiol.*, 33 :161 – 253.
- [633] Witter, M.P., Amaral, D.G. 1991. Entorhinal cortex of the monkey: Projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex. *J. Comp. Neurol.*, 307: 437 – 459.
- [634] Wittner, L., Henze, D.A., Záborszky, L., Buzsáki, G. 2007. Three-dimensional reconstruction of the axon arbor of a CA3 pyramidal cell recorded and filled in vivo. *Brain Struct. Funct.*, 212 (1) : 75 - 83.
- [635] Wittmann M, Guangping X, Michelle P, et al. 2008. *In vivo* pharmacodynamic effects of BQCA, a novel selective allosteric M1 receptor modulator. *Alzheimer Dement.*, 4 (Suppl 1) : T770.
- [636] Wolfe, M.S. 2006. Shutting down Alzheimer's. *Sci. Am.*, 294 : 72 – 79.
- [637] Wolfe, M.S. 2008. Inhibition and modulation of gamma-secretase for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, 5 : 391 - 398.
- [638] Wolozin, B., Wang, S.W., Li, N.C., Lee, A., Lee, T.A., Kazis, L.E. 2007. Simvastatin is associated with a reduced incidence of dementia and Parkinson's disease. *BMC Med.*, 5: 1 - 11.

- [639] Wong, R.K., Prince, D. A. 1981. Afterpotential generation in hippocampal pyramidal cells. *J. Neurophysiol.*, 45 : 86 – 97.
- [640] Wong, G.T., Manfra, D., Poulet, F.M., Zhang, Q., Josien, H., Bara, T., Engstrom, L., Pinzon-Ortiz, M., Fine, J.S., Lee, H.J., Zhang, L., Giggins, G.A., Parker, E.M. 2004. Chronic treatment with the  $\gamma$  - secretase inhibitor LY-411,575 inhibits  $\beta$ -amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. *J. Biol. Chem.*, 279 : 12876 – 12882.
- [641] Wonnacott, S., Barik, J., Dickinson, J., Jones, I.W. 2006. Nicotinic receptors modulate transmitter cross talk in the CNS: nicotinic modulation of transmitters. *J. Mol. Neurosci.*, 30 (1-2): 137 - 140.
- [642] Wozniak, M.A., Mee, A.P., Itzhaki, R.F. 2009. Herpes simplex virus type 1 DNA is located within Alzheimer's disease amyloid plaques. *J. Pathol.*, 217 (1) : 131 - 138.
- [643] Wright, C.I. 2009. The Human Amygdala in Normal Aging and Alzheimer's Disease En: Whalen, P.J., Phelps, E.A. eds. *The Human Amygdala*. Manhattan. p 382 - 405.
- [644] Wu, W.L., Zhang, L. 2009.  $\gamma$ -Secretase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease (Research Overview). *Drug Dev. Res.* 70 : 94 – 100.
- [645] Wu, J., Ishikawa, M., Zhang, J., Hashimoto, K. 2010. Brain Imaging of Nicotinic Receptors in Alzheimer's Disease. *Int. J. Alzheimers Dis.*, 2010 : 548913.
- [646] Wu, Y.Y., Cheng, I.H., Lee, C.C., Chiu, M.J., Lee, M.J., Chen, T.F., Hsu, J.L. 2011. Clinical Phenotype of G206D Mutation in the Presenilin 1 Gene in Pathologically Confirmed Familial Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.*, 25 (1) : 145 - 150.
- [647] Wuttke, T.V., Lerche, H. 2006. Novel anticonvulsant drugs targeting voltage-dependent ion channels. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 15 : 1167 – 1177.
- [648] Wuttke, T.V., Penzien, J., Fauler, M., Seebohm, G., Lehmann-Horn, F., Lerche, H., Jurkat-Rott, K. 2008. Neutralization of a negative charge in the S1-S2 region of the Kv7.2 (KCNQ2) channel affects voltage-dependent activation in neonatal epilepsy. *J. Physiol.*, 586 (2) : 545 - 555.
- [649] Wyss-Coray, T. 2006. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat. Med.*, 12 : 1005 - 1015.
- [650] Xiong, Q., Gao, Z., Wang, W., Li, M. 2008. Activation of Kv7 (KCNQ) voltage-gated potassium channels by synthetic compounds. *Trends Pharmacol. Sci.*, 29 (2) : 99 - 107.
- [651] Xu, W.L., Atti, A.R., Gatz, M., Pedersen, N.L., Johansson, B., Fatigioni, L. 2011. Midlife overweight and obesity increase late-life dementia risk A population-based twin study. *Neurology*, 76 (18): 1568 – 1574.
- [652] Yajeya, J., de la Fuente, A., Merchan, M. A., Riobobos, A. S., Heredia, M., Criado, J.M. 1997. Cholinergic Responses of Morphologically and Electrophysiologically Characterized Neurons of the Basolateral Complex in Rat Amygdala Slices. *Neuroscience*, 78 (3) : 731 - 743.

- [653] Yajeya, J., de la Fuente, A., Bajo, V., Riobos, A. S., Heredia, M., Criado, J.M. 1999. Muscarinic Activation of a Non selective Cationic Conductance in Pyramidal Neurons in Rat Basolateral Amygdala. *Neuroscience*, 88 (1) : 159 - 167.
- [654] Yajeya, J., de la Fuente, A., Criado, J.M, Bajo, V., Riobos, A. S., Heredia, M.. 2000. Muscarinic Agonist Carbachol Depresses Excitatory Synaptic Transmission in the Rat Basolateral Amygdala *In Vitro*. *Synapse*, 38 (1) : 151 - 160.
- [655] Yakel, J.L. 2010. Gating of nicotinic ACh receptors: latest insights into ligand binding and function. *J. Physiol.*, 588 : 597 - 602.
- [656] Ye, S., Huang, Y., Ilendorff, K.M., Dong, L., Giedt, G., Meng, E.C., Cohen, F.E., Kuntz, I.D., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W. 2005. Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid peptide production in cultured neuronal cells: ApoE structure as a potential therapeutic target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102 (51) : 18700 – 18705.
- [657] Yeung, S.Y., Pucovsky, V., Moffatt, J.D., Saldanha, L., Schwake, M., Ohya, S., Greenwood, I.A. 2007. Molecular expression and pharmacological identification of a role for K(v)7 channels in murine vascular reactivity. *Br. J. Pharmacol.*, 151 : 758 - 770.
- [658] Yue, C., Yaari, Y. 2004. KCNQ/M Channels Control Spike Afterdepolarization and Burst Generation in Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.*, 24 (19) : 4614 – 4624.
- [659] Yue, X., Lu, M., Lancaster, T., Cao, P., Honda, S., Staufenbiel, M., Harada, N., Zhong, Z., Shen, Y., Li, R. 2005a. Brain estrogen deficiency accelerates Abeta plaque formation in an Alzheimer's disease animal model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102 (52) : 19198 - 19203.
- [660] Yue, C., Remy, S., Su, H., Beck, H., Yaari, Y. 2005b. Proximal persistent Na<sup>+</sup> channels drive spike afterdepolarizations and associated bursting in adult CA1 pyramidal cells. *J. Neurosci.*, 25 : 9704 – 9720.
- [661] Yun, S.H., Gamkrelidze, G., Stine, W.B., Sullivan, P.M., Pasternak, J.F., Ladu, M.J., Trommer, B.L. 2006. Amyloid-beta<sub>1-42</sub> reduces neuronal excitability in mouse dentate gyrus. *Neurosci. Lett.*, 403 (1-2) : 162 – 165.
- [662] Yus-Najera, E., Santana-Castro, I., Villarroel, A. 2002. The identification and characterization of a noncontinuous calmodulin-binding site in noninactivating voltage-dependent KCNQ potassium channels. *J. Biol. Chem.*, 277: 28545 – 28553.
- [663] Zaczek, R., Saydoff, J. 1993. Depolarization activated releasers of transmitters as therapeutics for dementia: Preclinical characterization of linopiridine (DuP 996). *Curr. Opin. Invest. Drugs*, 2 : 1097 – 1104.
- [664] Zaczek, R., Chorvat, J. R., Saye, A. J., Pierdomenico, E. M., Maciag, M. C., Logue, R. A., Fisher, N.B., Rominger, H.D., Earl, A. R. 1998. Two new potent neurotransmitter release enhancers, 10,10- bis (4-pyridinylmethyl)- 9(10H)- anthracenone and 10,10 -bis (2-fluoro-4-pyridinylmethyl) -9 (10H) - anthracenone: comparison to linopiridine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285: 724 – 730.



- [665] Zhang, H., Craciun, L.C., Mirshahi, T., Rohács, T., Lopes, C. M.B., Jin, T., Logothetis, D. E. 2003. PIP2 activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron*, 37: 963 – 975.
- [666] Zhang, X., Zhou, K., Wang, R., Cui, J., Lipton, S.A., Liao, F.F., Xu, H., Zhang, Y.W. 2007. Hypoxia - inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) - mediated hypoxia increases BACE1 expression and  $\beta$ -amyloid generation. *J. Biol. Chem.*, 282 : 10873 – 10880.
- [667] Zhao, G., Mao, G., Tan, J., Dong, Y., Cui, M.Z., Kim, S.H., Xu, X. 2004. Identification of a new presenilin dependent zeta-cleavage site within the transmembrane domain of amyloid precursor protein. *J Biol. Chem.*, 279 : 50647 – 50650.
- [668] Zhao, G., Liu, Z., Ilagan, M.X., Kopan, R. 2010. Gamma-secretase composed of PS1/Pen2/Aph1a can cleave notch and amyloid precursor protein in the absence of nicastrin. *J. Neurosci.*, 30 (5) :1648 - 1656.
- [669] Zhao, W., Wang, J., Hoa, L., Onob, K., Teplow, D.B., Giulio M. Pasinetti, G.M. 2009. Identification of Antihypertensive Drugs Which Inhibit Amyloid- $\beta$  Protein Oligomerization. *J. Alzheimers Dis.*, 16: 49 – 57.
- [670] Zotova, E., Nicoll, J.A., Kalaria, R., Holmes, C., Boche, D. 2010. Inflammation in Alzheimer's disease: relevance to pathogenesis and therapy. *Alzheimers Res. Ther.*, 2 (1) : 1 – 9.
- [671] Zou, X., Coyle, D., Wong-Lin, K. F., Maguire, L. 2011. A modelling study of beta-amyloid induced change in hippocampal theta rhythm. Available from *Nature Precedings*. <<http://dx.doi.org/10.1038/npre.2011.6004.1>>
- [672] Zouridakis, M., Zisimopoulou, P., Poulas, K., Tzartos, S.J. 2009. Recent advances in understanding the structure of nicotinic acetylcholine receptors. *IUBMB Life*, 61(4) : 407 - 423.